

# Effekt av statiner på de lysosomale cysteinproteasene legumain, cathepsin B og L i monocytt/makrofager

Eyassu Tewolde



## Mastergradsoppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap  
Farmasøytisk institutt  
Det matematiske-naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

15. mai 2011

# **Effekt av statiner på de lysosomale cysteinproteasene legumain, cathepsin B og L i monocytter/makrofager**

**Eyassu Tewolde**



## **Mastergradsoppgave i farmasi**

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap  
Farmasøytisk institutt  
Det matematiske-naturvitenskaplige fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

15. mai 2011

### **Veiledere:**

Professor Rigmor Solberg  
Professor Harald Thidemann Johansen

## Forord

*Denne masteroppgaven ble utført ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden fra august 2010 til mai 2011.*

*En stor takk rettes først til mine veiledere, Professor Rigmor Solberg og Professor Harald Thidemann Johansen for svært god oppfølging og inspirasjon under arbeidet med masteroppgaven. Takk for uvurderlig hjelp og nytteige tilbakemeldinger under skriveprosessen.*

*Takk til avdelingsingeniør Hilde Nilsen ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap for opplæring i den praktiske delen av oppgaven, og spesielt for hjelpen med de siste forsøkene, inkluderte Western blotting og zymografi.*

*Takk til stipendiat Robert Smith for god hjelp i forbindelse med de ulike figurer i masteroppgaven og praktisk veiledning med Westernblotting.*

*Jeg vil også takk Islam M. Yaseen, andre medstudenter og alle ansatte ved avdelingen i fjerde etasje for et godt og hyggelig arbeidsmiljø gjennom hele hovedfagsåret.*

*Takk til familien min for støtte og engasjement gjennom hele studietiden.*

*Oslo, mai 2011*

*Eyassu Tewolde*

# Innhold

<b>FORORD .....</b>	<b>3</b>
<b>INNHold .....</b>	<b>4</b>
<b>FORKORTELSER .....</b>	<b>7</b>
<b>SAMMENDRAG.....</b>	<b>9</b>
<b>1. INNLEDNING .....</b>	<b>10</b>
1.1 ATEROSKLEROSE.....	10
1.1.1 Makrofagers rolle i aterosklerose .....	11
1.1.2 Ustabile aterosklotiske plakk.....	12
1.2 PROTEASER .....	12
1.2.1 Metalloproteaser .....	13
1.2.2 Cysteinproteaser .....	14
Legumain .....	14
Cathepsin B og L.....	15
1.3 STATINER .....	16
1.3.1 Atorvastatin.....	17
1.3.2 Simvastatin .....	19
1.4 MÅL FOR OPPGAVEN .....	20
<b>2. MATERIALER OG METODER .....</b>	<b>21</b>
2.1 KJEMIKALIER OG REAGENSER .....	21
2.2 UTSTYR .....	22
2.3 CELLEDYRKING .....	23
2.3.1 RAW 264,7 celler .....	23
Tining av celler .....	23
Dyrking av cellelinjen .....	24

---

Splitting og telling av celler.....	24
2.3.2 Isolering av humane primære monocytter .....	24
2.3.3 Tillaging av statin-oppløsninger.....	25
2.3.4 Høsting av celler.....	25
2.4 ENZYMAKTIVITETSMÅLING.....	26
2.4.1 Legumainaktivitet.....	26
2.4.2 Cathepsin B-aktivitet.....	26
2.4.3 Cathepsin L-aktivitet.....	27
2.5 TOTALPROTEINMÅLING.....	27
2.6 WESTERN BLOTTING .....	28
2.7 ZYMOGRAFI .....	28
2.8 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) .....	29
2.9 STATISTISKE ANALYSER .....	29
<b>3. RESULTATER.....</b>	<b>31</b>
3.1 ATORVA- OG SIMVASTATIN HEMMER LEGUMAIN- OG CATHEPSIN B-AKTIVITET I RAW 264,7 CELLER. 31	
3.2 ATORVASTATIN HEMMER LEGUMAIN- , CATHEPSIN B- OG L-AKTIVITET I HUMANE PRIMÆRE MONOCYTTER. ....	34
3.3 TIDSRESPONS AV ATORVASTATIN PÅ LEGUMAIN- OG CATHEPSIN B-AKTIVITET I RAW 264,7 CELLER. 37	
3.4 EFFEKT AV RANKL OG ATORVASTATIN PÅ MMP-2 OG -9 I RAW 264,7 CELLER. ....	39
<b>4. DISKUSJON .....</b>	<b>43</b>
4.1 CELLEMODELLER OG METODER .....	44
4.2 STATINER HEMMER LEGUMAIN-, CATHEPSIN B- OG L-AKTIVITET .....	44
4.3 EFFEKT AV STATINER PÅ MMP-2 OG -9 .....	48
<b>5. KONKLUSJON .....</b>	<b>50</b>

---

<b>REFERANSELISTE.....</b>	<b>51</b>
<b>APPENDIKS .....</b>	<b>55</b>

## Forkortelser

AEP	Asparaginylendopeptidase
APC	Antigenpresenterende celle
CA-074	L-trans-epoksysuksinyl-isoleucin-prolin-metylester propylamid
CHAPS	3-[(3-kolamidopropyl)-dimetylammonio]-1- propansulfonat
CYP3A4	Cytokrom P450 3A4
DC	Dendrittisk celle
DMSO	Dimetylsulfoksid
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
IC <sub>50</sub>	"Half maximal inhibitory concentration"
ICAM-1	Intercellulært adhesjonmolekyl-1
IL	Interleukin
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
kDa	Kilodalton
LDL	"Low density" lipoprotein
M-CSF	Makrofag kolonistimulerende faktor
MHC	"Major histocompatibility complex"
MMP	Matriks metalloproteinase
mRNA	"Messenger" ribonukleinsyre
OATP1B1	"Organic anion transporting polypeptide 1B1"
OxLDL	Oksidert "low density" lipoprotein
P-gp	"Permeability"- glykoprotein
PPAR	Peroksisom proliferator-aktivert reseptor
RANKL	"Receptor activator of nuclear factor-kB ligand"
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfeil ("standard error of the mean")
SR	"Scavenger" reseptor
TEMED	Tetrametyletylendiamin
TLR-9	"Toll-like" reseptor-9

---

TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TGF- $\beta$	”Transformering” vekstfaktor- $\beta$
UGT	Uridin difosfoglucuronosyltransferase
VCAM-1	Vaskulært celledhesjonmolekyl-1
Z-Ala-Ala-Asn-NHMec	Benzyloksykarbonyl-alanin-alanin-asparagin-7-(4-metyl)-kumarylamid
Z-Arg-Arg-AMC	Benzyloksykarbonyl-arginin-arginin-7-amino-4-metylkumarin
Z-Phe-Arg-NHMec	Benzyloksykarbonyl-fenylalanyl-arginin-7-(4-metyl)-kumarylamid



## Sammendrag

Aterosklerose er en progressiv sykdom hvor lipider, ekstracellulære matriks og aktiverte vaskulære glattmuskelceller akkumuleres i arterieveggen og fører til vekst av et aterosklerotisk plakk. Monocytt/makrofager spiller en viktig rolle både i begynnelsen og under utviklingen av aterosklerose og etter opptak av oxLDL blir de til skumceller. Makrofager er hovedkilden til noen av de proteasene som fører til destabilisering av plakk ved nedbrytning av ekstracellulær matriks og plakkets fibrøse kappe. De lysosomale cysteinproteasene legumain, cathepsin B og L, og metalloproteasene MMP-2 og -9 er tidligere vist å uttrykkes i makrofager.

I denne studien ble RAW 264,7 (en makrofaglignende cellelinje fra mus) og primære humane monocytt som ble differensiert til makrofager med M-CSF ("macrophage colony-stimulating factor"), inkubert med ulike konsentrasjoner av syre- og laktonformene av atorva- og simvastatin. Enzymaktivitet av legumain, cathepsin B og L ble målt i cellelysat ved hjelp av spesifikke substrater. Legumainmengde ble målt både i cellelysat og kondisjonert medium ved hjelp av ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay"), og i tillegg ble proteinuttrykket av legumain analysert ved hjelp av Western immunoblotting. Tilstedeværelsen av MMP-2 og -9 ble analysert ved hjelp av zymografi.

Både legumain- og cathepsin B-aktivitet ble signifikant redusert doseavhengig (0,1-200  $\mu$ M) med både syre- og laktonformene av atorva- og simvastatin i begge cellemodellene. Legumain- og cathepsin B-aktiviteten ble sammenlignet i adherente og ikke-adherente RAW 264,7 celler etter statinstimulering, og adherente celler viste høyest enzymaktivitet i forhold til kontroll. I tillegg viste både syre- og laktonformen av atorvastatin en signifikant cathepsin L-aktivitetsreduksjon i stimulerte primære monocytt. ELISA-målingene viste at også legumainmengden ble redusert signifikant i cellelysat etter behandling med begge atorvastatinformene. I tillegg ble det vist at store mengder legumain skilles ut ekstracellulært og at begge atorvastatinformene reduserte utskillelsen signifikant. Selv om det etter immunoblotting ble vist en reduksjon i både pro- og aktiv form, var det en større reduksjon av aktiv form ved de høyeste statinkonsentrasjonene. Statin stimulering av RAW 264,7 celler viste økt sekresjon av MMP-9, men ikke MMP-2 i doser på 100  $\mu$ M. Resultatene i denne oppgaven viser for første gang at statiner signifikant reduserer aktiviteten av de lysosomale cysteinproteasene legumain, cathepsin B og L, samt ekstracellulær utskillelse av legumain.

# 1. Innledning

## 1.1 Aterosklerose

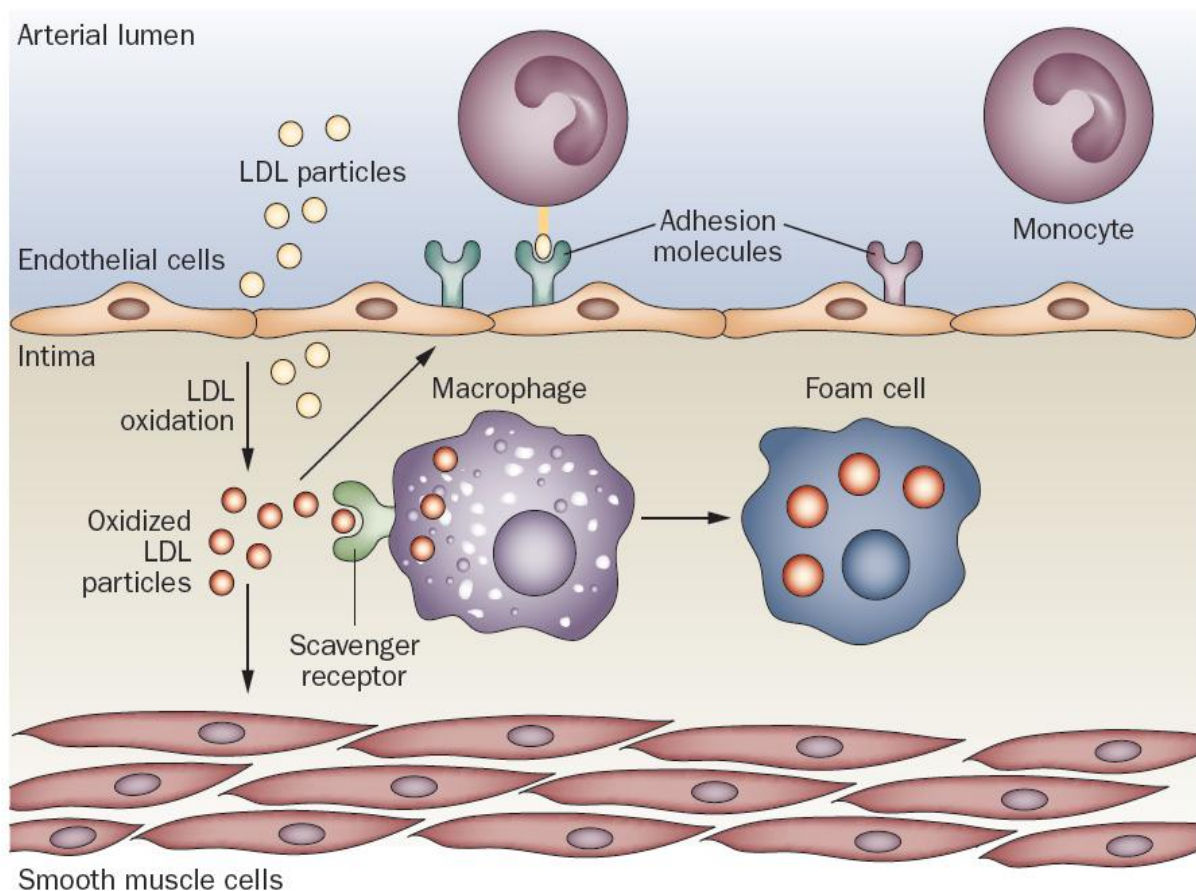
Begrepet "arteriosclerosis" ble første gang introdusert i 1829 av Jean Lobstein [1]. Aterosklerose er en kronisk sykdom som bidrar til høy mortalitet og morbiditet i vestlige land [2]. Forstyrrelse i funksjonen til endotelcellene er første steg i aterosklerose, og det kan være flere årsaker til dette, blant annet høyt kolesterol og andre kardiovaskulære risikofaktorer. Aktiverte endotelceller stimulerer monocytter, T-celler og blodplater til å migrere til intima som er det inneste laget av arterier [3, 4]. I tillegg uttrykker endotelcellene flere adhesjonsmolekyler som vaskulær celleadhesjonsmolekyl-1 (VCAM-1), intercellulæradhesjonsmolekyl-1 (ICAM-1) og "platelet" selektin (p-selektin), og disse hjelper monocyttene til å adherere og migrere [5].

LDL ("low density" lipoprotein) er en type lipoprotein som inneholder fosfolipider, kolesterol estere og triglyserider med fritt kolesterol. LDL-oksidasjon indueres av forskjellige oksidanter og LDL kan oksideres i arterieveggen og perifert i inflammatorisk områder [6]. Det oksiderte LDL (oxLDL) stimulerer produksjon av flere cytokiner og kjemokiner fra makrofager, glattmuskelceller og endotelceller [7]. Noen cytokiner som er involvert i aterosklerose er TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, CXCL8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- $\gamma$ , M-CSF, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 og TGF- $\beta$ 3, og disse har enten proinflammatorisk eller anti-inflammatorisk effekt [8].

Det er flere typer celler som er involvert i aterosklerose, blant annet T-lymfocytter, monocytter/makrofager (se 1.1.1), mastceller og glattmuskelceller. Ved hjelp av adhesjonsmolekyler vandrer T-lymfocytene inn til intima og blir aktivert av antigenpresenterende celler (APCs). Deretter differensierer cellene og blir enten T helper 1 ( $T_h1$ ) eller T helper 2 ( $T_h2$ ) celler [9], der  $T_h1$ -celler stimulerer plakkdannelse og  $T_h2$ -celler kan ha hemmende effekt på  $T_h1$ -cellene [4]. Mastceller har vist å ha effekt på plakktutvikling i en *in vivo* studie og cellene produserer proinflammatoriske cytokiner som IL-6, IFN- $\gamma$  og TNF- $\alpha$ , som bidrar til aterogenese [10, 11]. Glattmuskelceller er kjent som de største ekstracellulære matriksprodusentene. I tillegg induserer glattmuskelceller vandring av monocytter fra blodomløpet til intima, der de beskytter monocyttene fra apoptose [12].

### 1.1.1 Makrofagers rolle i aterosklerose

Monocyttene vandrer i blodsirkulasjon, og deres oppgave er blant annet å fjerne døde celler og toksiske molekyler. I tillegg har cellene en annen rolle og det er fornyelse av makrofager og dendritiske celler. Under inflammasjon vandrer monocytterne til intima, hvor de differensierer til makrofager [13]. Nylig ble det kjent at det eksisterer to subtyper makrofager, kalt M1 og M2. M1 skiller ut proinflammatoriske cytokiner, slik som TNF- $\alpha$  og IL-1, og dette fører til at flere immunceller tiltrekkes, samt opptak og akkumulering av LDL inne i arterieveggen. M2-cellene kan ha motsatt effekt, dvs. de skiller ut antiinflammatoriske cytokiner som IL-10 og TGF- $\beta$ , som kan dempe inflammasjonen [9].



**Figur 1-1:** LDL-effekt i arterieveggen. LDL tas opp i arterieveggen og samles i intima, der de modifiseres til oksidert LDL (oxLDL). OxLDL induserer aktivering av endotelceller og produksjon av adhesjonsmolekyler, som bidrar til migrering av monocytter til arterieveggen, hvor de differensierer til makrofager. I tillegg tar makrofager opp oxLDL og danner skumceller, som er et viktig steg i utvikling av et aterosklerotisk plakk [14].

Etter at LDL er modifisert enten ved oksidering eller aggregering, blir det tatt opp av makrofager ved hjelp av "scavenger" reseptorer (SR) A og CD36. Dette fører til at store mengde fettstoffer (inkludert kolesterol) samles intracellulært og makrofagene omdannes til skumceller (Figur 1-1) [2]. OxLDL stimulerer p38 MAP kinase-aktivitet, som blant annet er involvert i PPAR ("peroxisome proliferator-activated receptor") induisert transkripsjon av CD36, som aktiverer lipidopptak og dannelse av skumceller [15].

### 1.1.2 Ustabile aterosklerotiske plakk

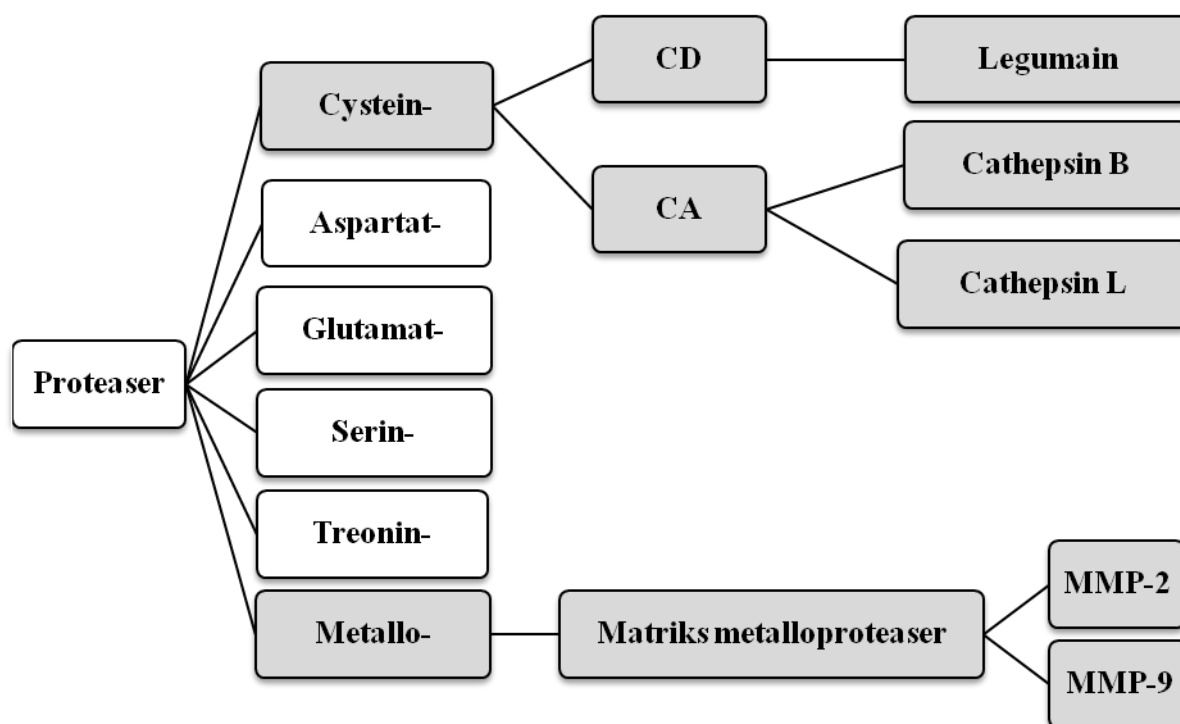
Fettstoffer akkumuleres i makrofager, en slik fettansamling kalles "fatty steak" og fører til utvikling av et aterosklerotisk plakk [16]. Bunnen av plakken er rikt på ekstracellulært fett og rester av døde celler. Over dette, er det en ansamling av glattmuskelceller, makrofager og lymfocytter. Makrofagene og de glatte muskelcellene inneholder store mengde kolesterol og andre fettstoffer, og dermed fungerer de som fettlager. På plakkoverflaten er det et bindevevsområde som blir kalt fibrøs kappe ("fibrous cap"), som inneholder glattmuskelceller, fiberholdig bindevev og innimellom makrofag-skumceller [17]. Det har vært påstander om at aterosklerose er avhengig av en nydannelse av blodkar, kalt "vasa vasorum", og blodkarets funksjon er å levere næringsstoffer og oksygen til åreveggen og fjerne avfallsprodukter [5].

Utviklingen fra en stabil plakk til en ustabil plakk innebærer brudd eller erosjon. Vanligvis har plakket en tynn betent fibrøs kappe som dekker fettavleiringen [18]. Brudd i den fibrøse kappen og plakkerosjon fører til at prokoagulerende faktorer kommer i kontakt med blod, som videre fører til akutt trombose. Aktiverte makrofager uttrykker flere ekstracellulære proteaser, deriblant cathepsiner og matriks metalloproteaser (MMP) som ødelegger cellefunksjon og overlevelse av makrofager og glattmuskelceller, og fremmer enzymatisk degradering av den fibrøse kappen [9].

## 1.2 Proteaser

Proteaser har en viktig rolle i levende organismer ved nedbryting av proteiner og er blant annet involvert i immunresponser, blodkoagulering og sårhelbredning. Proteaser er klassifisert i seks forskjellige klasser med hensyn til katalytisk mekanisme og aktivt sete, og disse er aspartat-, glutamat- (ikke funnet i pattedyr), metallo-, cystein-, serin- og treoninproteaser. Proteaser spalter proteinsubstrater enten i karboksy- (C-) eller amino- (N-) terminal ende

(eksopeptidaser), eller midt i molekylet (endopeptidaser) [19-21]. De ulike klassene deles videre inn i familier basert på likheter i aminosyresekvens, og familier samles til klaner på grunn av deres likheter i tredimensjonal struktur [19].



**Figur 1-2:** Oversikt og inndeling av de proteasene som er inkludert i denne studien (grå bokser).

### 1.2.1 Metalloproteaser

Metalloproteaser har et katalytisk sinkion i det aktive setet. Matriks metalloproteaser (MMP) er en del av metalloproteasene som omfatter en familie av ekstracellulære matriksnedbrytende proteaser. Under fysiologisk forhold som morfogenese, angiogenese og sårhelbredelse, har MMPer en viktig rolle i vevsremodellering [22]. MMP-2 og -9 er undergrupper av MMP som har blant annet elastin og gelatin som substrater (Fig 1-2) [23].

Både MMP-2 og -9 er involvert i glattmuskelmigrasjon og -proliferasjon som bidrar til intima fortykning [24]. Glattmuskelceller inneholder større mengder av de aktive formene av MMP-2 og -9 i aterosklerotisk plakk enn normalt (ikke aterosklerotisk tilstand) [25]. Under

aterosklerotisk plakkuvikling uttrykker aktiverte makrofager MMPer som degraderer ekstracellulær matriks og svekker dermed den fibrøse kappen [3]. MMP-9 modulerer aktivitet av andre proteaser, vekstfaktorer, cytokiner og kjemokiner gjennom proteolytisk kløyving [26].

### 1.2.2 Cysteinproteaser

Hittil er det kjent 72 familier av cysteinproteaser, som videre er delt i klaner. Klan CD inneholder 6 proteinfamilier, deriblant asparaginylendopeptidase eller legumain (C13; Fig 1-2) [27]. Klan CA er inndelt i flere proteinfamilier, deriblant papainfamilien (C1) [28, 29] som inneholder blant annet cathepsin B, C, F, H, K og L, og de fleste av disse er endopeptidaser (Fig 1-2) [28, 30]. Det er flere endogene inhibitorer av cysteinproteaser, deriblant stefiner, kininogener og cystatiner. Cystatiner er kompetitive og reversible inhibitorer av cysteinproteaser [31].

#### *Legumain*

Asparaginylendopeptidase (AEP) ble første gang funnet 1987 i ulike *legume* frø og fikk det anbefalte navnet legumain (EC 3.4.22.34). Senere ble legumain også funnet i pattedyr (menneske og gris) [32-35]. Legumain er en lysosomal cysteinprotease og en spesifikk asparaginylendopeptidase [36]. Under fysiologiske forhold er legumain i sure endosomer og/eller lysosomer, og degraderer intracellulære proteiner [37]. Legumain er ikke i slekt med andre lysosomale cysteinproteaser som cathepsin S, B, L, og H, men det er foreslått at legumain har et evolusjonært slektskap til caspaser [38]. Enzymet har noen kjente substrater, deriblant det ekstracellulære matriksprotein fibronektin [39],  $\alpha$ -thymosin [40], pro-MMP-2 (progelatinase A) og cathepsin B, L og H [41].

En studie som ble gjort på mus som manglet legumain, har vist at legumain har en rolle i proteinkatabolisme i proksimaltubulærceller og er nødvendig for nyrefunksjon [42]. En annen biologisk funksjon av legumain er bearbeiding av antigen for presentering til klasse II "major histocompatibility complex" (MHC) [43]. Mangel på legumain har vist å redusere intracellulær "toll-like" reseptor 9 (TLR 9) i dendritiske celler [44]. I tillegg har legumain en rolle i beinresorpsjon ved at det hemmer osteoklastedannelse [45]. Mengde og aktivitet av legumain er økt i ustabile aterosklerotiske plakk i forhold til stabile plakk og dette fører til økt aktivering av cathepsin L, som er knyttet til plakktvikling [36, 46].

Legumain gjennomgår flere trinn av autokatalytisk spalting både C- og N-terminalt for å danne en aktiv form. Enzymet er aktivt bare ved sure betingelser (pH 3-6) og blir ustabil ved pH over 6. En signifikant mengde av det inaktive proenzymet (56 kDa) blir spaltet ved pH 5 og danner en ny inaktiv form av enzymet (47 kDa). Videre blir dette spaltet ved pH mellom 3.5-4.5 til en aktiv form (46 kDa). Andre ukjente lysosomale proteaser kan være involvert i videre spalting av enzymet til en aktiv form på 36 kDa [36, 38]. Den aktive formen av enzymet hydrolyser spesifikt karboksyterminalt for aminosyren asparagin. Enzymet finnes i de fleste vev, men uttrykkes høyest i nyre og placenta hos pattedyr [35, 47]. Legumain blir hemmet av flere inhibitorer, deriblant iodoacetat, iodoacetamid, cystatin C og E/M. Både cystatin C og E/M er potente endogene inhibitorer av legumain [35, 48].

### *Cathepsin B og L*

Cathepsin B og L er lysosomale cysteinproteaser i likhet med legumain og enzymene degraderer gamle og unødvendig proteiner til aminosyrer som kan brukes om igjen. Både cathepsin B og L er høyt uttrykt i nyre, milt, lever og hjernevev [49]. Det ble antatt at cathepsin B og L kan ha en rolle i kreft og katalysere nedbryting av ekstracellulær matriks [31, 50]. I tillegg er cathepsin B og L funnet i nekrotiske kjerner ("necrotic core") av aterosklerotiske plakk, hvor de uttrykkes av skumceller, i en studie på mus som mangler apolipoprotein E [51]. Modifisert LDL overfører cathepsin B og L fra lysosomene til cytosol (sannsynligvis som følge av lysosomalt membranbrudd), hvor de kan fungere som spaltningsenzym i apoptose og etter hvert bidrar til dannelsen av nekrotiske kjerner. Både cathepsin B og L er aktive i surt miljø og er svakt aktive ved nøytral pH [30].

Cathepsin B er til stede både intra- og ekstracellulært, og ekstracellulært finnes enzymet både som løselig form eller bundet til plasmamembranen og ekstracellulær matriks [31]. Hemming av cathepsin B reduserer lysosomal nedbryting av modifisert LDL og dermed induseres dannelsen av skumceller [30]. Cathepsin B er både en eksopeptidase (karboksylpeptidase) og en endopeptidase, og proformen har molekylvekt (MW) på 39 kDa, mens aktive former finnes med MW på 29 kDa og 26 kDa [49].

En studie på 49 aterosklerosepasienter viste at det er samsvar mellom uttrykk av cathepsin L, nekrotisk kjernedannelse og brudd av aterosklerotiske plakk. I tillegg viste studien at det er makrofagene som uttrykker cathepsin L og som er knyttet til apoptose og ustabilitet av plaketten [52]. Cathepsin L er en endopeptidase, med MW på 39 kDa i proform, og 29 kDa og

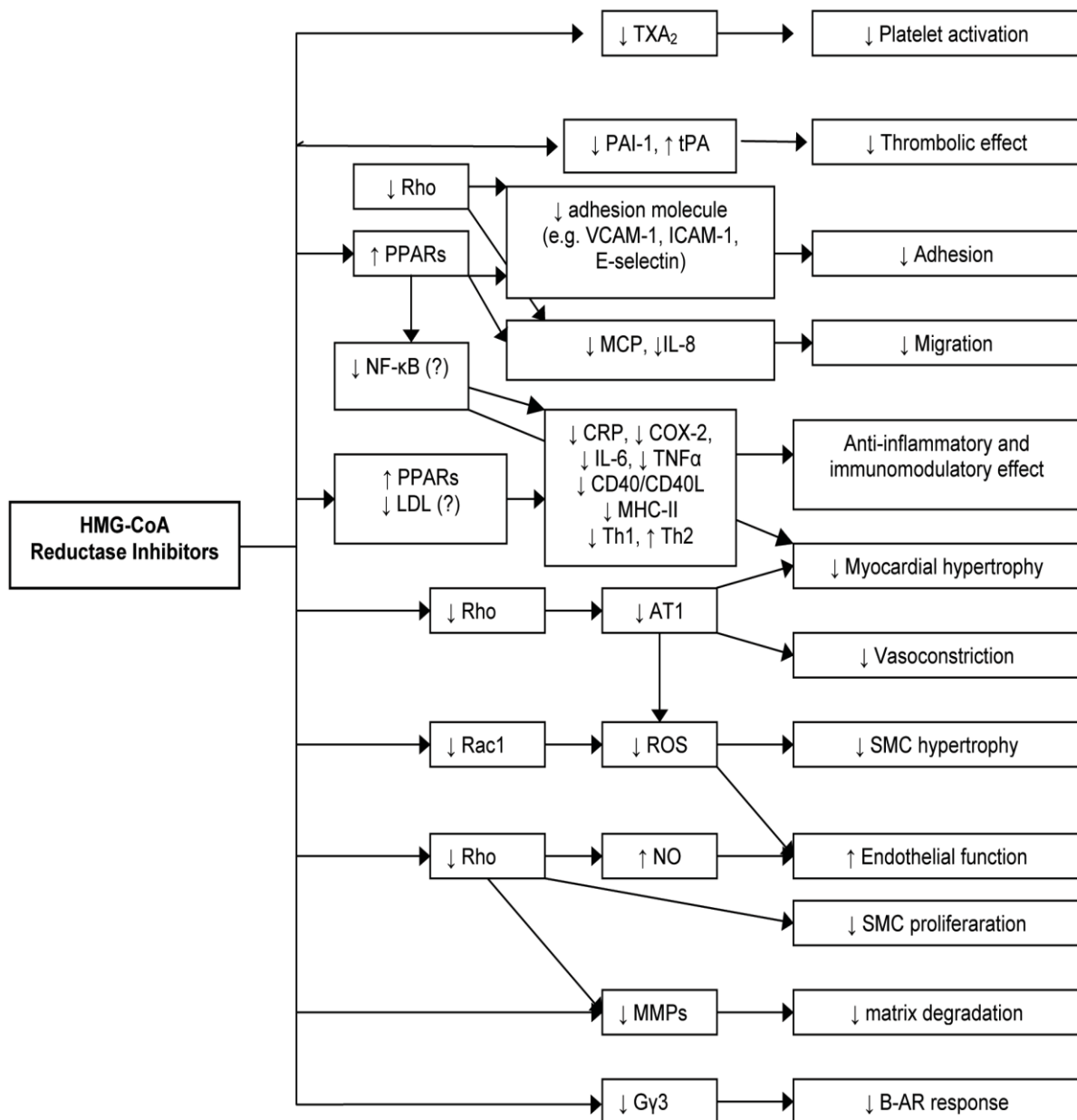
22 kDa i aktiv form [49]. Cystatin C viser høy hemming av både cathepsin B og L og det er vist at cystatin C-nivået er redusert i humane aterosklerotiske plakk [30].

### 1.3 Statiner

Kolesterol har en sentral rolle i å opprettholde cellemembranens helhet og fysiologiske funksjoner i kroppen, men høy konsentrasjon av kolesterol kan føre til patologiske tilstander som aterosklerose [53]. Kolesterol i kroppen kommer både fra kosthold og fra det som er syntetisert i kroppen, hovedsakelig i leveren. Ved for høyt kolesterolnivå reduseres vanligvis kolesterolsyntese fra leveren for å regulere mengden i kroppen og dette skjer ved ”feedback”-hemming av 3-hydroksy-3-metylglutaryl CoA (HMG-CoA) reduktase, som katalyserer omdanning av HMG-CoA til mevalonat. Kolesterolproduksjonen øker i lever mer enn det som er absorbert, selv om kosten inneholder høy konsentrasjon av kolesterol [54]. Derfor er det viktig med effektive midler som kan redusere kolesterolnivået i kroppen. Den første HMG-CoA reduktasehemmeren (statin) var kompaktin, som ble oppdaget i 1976. Siden kom flere andre statiner på markedet, deriblant lovastatin, fluvastatin, atorvastatin, simvastatin, provastatin og cervastatin [53, 54].

Statiner hemmer også mevalonatmetabolitter, inkludert farnesylpyrofosfat og geranylgeranylpyrofosfat, som stimulerer prenylering av noen proteiner og slike prenylerte proteiner er involvert i en rekke cellulære prosesser som signaltransduksjon, differensiering og proliferasjon [55]. I tillegg har statiner kolesterol-uavhengige effekter eller såkalte pleiotrope effekter, deriblant forbedring av endotelcellefunksjon, reduksjon av vaskulære glattmuskelceller og makrofagproliferasjon, stabilisering av aterosklerotiske plakk, antioksidanteffekt, antiinflammatorisk og immunmodulerende effekt og reduksjon av plateaktivitet. En annen pleiotropisk effekt av statiner er reduksjon av MMPer, blant annet MMP-2 og -9 (Fig 1-3) [56].



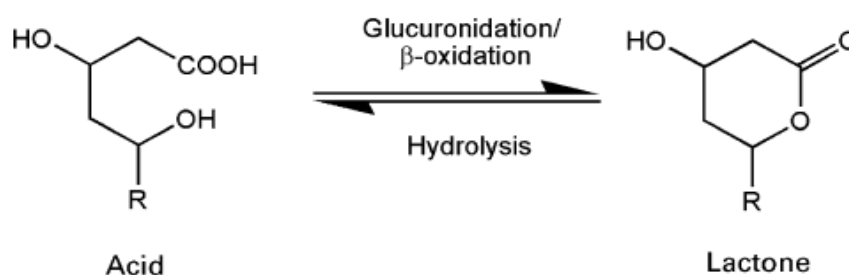


**Figur 1-3:** Pleiotrope effekter av statiner (HMG-CoA-reduktasehemmere), inkludert hemming av migrasjon, adhesjon, glattemuskelcelle-proliferasjon og -hypertrofi, forbedring av endotelcellefunksjon og aterosklerotisk plakkstabilitet, forhindring av trombotisk respons, og reduksjon av oksidativt stress, vasokonstriksjon og vaskulær inflammasjon. Piler indikerer øking (↑) eller reduksjon (↓) av aktivitet eller proteinuttrykk etter behandling med statiner[56].

### 1.3.1 Atorvastatin

Atorvastatin, i likhet med de andre statinene, fremmer en reduksjon i hepatisk kolesterolsyntese og en kompenserende oppregulering av hepatisk LDL-reseptorer som fører til økt opptak og nedbrytning av LDL-kolesterol. Atorvastatinkalsium er syntetisk, lipofil,

uløselig i vandige løsninger ( $\text{pH} \leq 4$ ), veldig tungt løselig i vann, tungt løselig i etanol og godt løselig i metanol [57]. Atorvastatin administreres medikamentelt som aktiv syreform og omdannes *in vivo* til likevekt mellom syre- og laktonformen (Fig 1-4) [58]. Denne konverteringen av syre- til laktonform er mediert via UGT1A1 (”uridine diphosphoglucuronosyltransferase 1A1”), UGT1A3 og  $\beta$ -oksidase, og syreformen kan redannes ved spontan hydrolyse [59, 60].



Statin	R
Atorvastatin	
Simvastatin	

**Figur 1-4:** Kjemisk struktur av syre- og laktonformer av atorvastatin og simvastatin. Omdannelsen mellom syre- og laktonform er vist øverst, og strukturer av R-sidekjeden (R) i de to statinene er gitt i tabellen. Plasseringen av syre- eller laktonsidekjeden (R) er vist med en asterisk (\*). (Modifisert fra [58]).

Atorvastatin er et substrat for CYP3A4 (”cytochrome P450 3A4”) og OATP1B1 (”organic anion transporting polypeptide 1B1”) i lever, hvor det tas opp aktivt [55]. I en randomisert studie med 534 pasienter som ble behandlet med fem ulike statiner, viste atorvastatin å ha større lipidreduserende effekt enn de andre statinene [61]. I en annen dobbelblindstudie med

40 aterosklerosepasienter som varte i 12 uker, viste atorvastatin å redusere uttrykket av legumain mRNA [62].

### 1.3.2 Simvastatin

Simvastatin er et syntetisk derivert fermenteringsprodukt fra *Aspergillus* og har blitt brukt som kolesterolsenkende i over 20 år [63]. Simvastatin er et hvitt, krystallinsk, ikke hygroskopisk pulver som er uløselig i vann [64]. Simvastatin administreres medikamentelt som et lakton-prodrug og i likhet med atorvastatin omdannes det *in vivo* og til likevekt mellom lakton- og syreform (Fig 1-4) [58]. Laktonformen kan hydrolyseres til syreform enten kjemisk eller enzymatisk av esteraser eller paraoksanaser [60, 65].

Simvastatin er et lipofilt stoff som lett krysser plasmamembranen og derfor absorberer godt fra tarmen. Legemidlet er et godt substrat for CYP3A4 og P-glykoprotein (P-gp) og disse enzymene har stor rolle i eliminasjon av simvastatin [55]. Spesielt laktonformen av simvastatin har vist høyt potensial for muskelbivirkninger (myopati) i forhold til fluvastatin, atorvastatin og pravastatin [58]. Det er nylig laget kombinasjonspreparater med simvastatin, blant annet med ezetimibe (hemmer kolesterolabsorpsjon fra tarmen) eller niacin. Kombinasjonen med niacin og simvastatin har vist til å redusere LDL med 20 % mer enn bare simvastatin alene [63, 64].

---

## 1.4 Mål for oppgaven

Monocytter/makrofager er sentrale i inflammatoriske prosesser og i utvikling av aterosklerose, og disse cellene uttrykker cysteinproteasene legumain, cathepsin B og L, og metalloproteasene MMP-2 og -9. I en human aterosklerotisk plakkstudie er det vist at proteinuttrykket av legumain, cathepsin B og MMP-9 øker i ustabile plakk i forhold til i stabile plakk [46]. I en annen pasientstudie har atorvastatin vist å nedregulere uttrykket av legumain mRNA i monocytter/makrofager [62].

Det er derfor ønskelig å undersøke nærmere hvilken betydning ulike former (syre-/laktonform) av statiner (atorvastatin og simvastatin) har for regulering av både uttrykk og aktivitet av legumain, cathepsin B og L, og MMPs i monocytter/makrofager.

Konkrete mål for oppgaven:

- Undersøke effekten av ulike konsentrasjoner av statinene på proteaseaktivitet og -uttrykk (dose-respons) i en makrofagcellelinje fra mus (RAW 264,7) og i primære humane monocytter/makrofager.
- Undersøke effekten av atorvastatin over 10 dager på proteaseaktivitet (tids-respons) i RAW 264,7 celler.

## 2. Materialer og metoder

### 2.1 Kjemikalier og reagenser

Kjemikalier og reagenser	Leverandør
Akrylamid/Bis løsning (30 %) (161-0156)	Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA
Albumin standard (23209)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Atorvastatin Kalsiumsalt (A791750)	Toronto Research Chemicals (TRC), North York, Ontario, Canada
Atorvastatin-lakton (A791780)	Toronto Research Chemicals (TRC), North York, Ontario, Canada
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (500-0006)	Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA
Brij™ 35 (Polyoxyethylene lauryl ether) CA-074	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Cathepsin L Inhibitor III (Z-Phe-Tyr(t-Bu)-diazomethylketone)	Merck, Darmstadt, Tyskland
CHAPS (C3023-IG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Dinatrium-EDTA (00 064)	Ferak Berlin, Tyskland
Dinatriumhydrogenfosfat (28029.292)	VWR Prolabo, Fontenay, Frankrike
DMSO, dimetylsulfoksid, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO (D2650)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
DTT, ditiotreitol (438117)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
ECL™ Blotting Detection Reagents (RPN 2209)	GE Healthcare/Amersham, Buckinghamshire, Storbritannia
FBS gold, Føtalt bovinserum gold, (PAA A15-649)	PAA Laboratories, Pasching, Australia
Fettfri tørrmelk	Normilk, Levanger, Norge
Human Total Legumain Duoset (DY 4769, R&D Systems)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Kodak X-Ray developer, fremkaller (5070933)	Carestream Health, Rochester, NY, USA

Kodak X-Ray fixer (507 1071)	Carestream Health, Rochester, NY, USA
Metanol, CH <sub>3</sub> OH (1.06018.2500)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumacetat, NaC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O (6267.0500)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumklorid, NaCl (1.06404.1000)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Penicillin-Streptomycin (P0781)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Human Legumain Affinity Purified Polyclonal Ab, Goat IgG (AF2199)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins (P0160)	Dakocytomation, Glostrup, Denmark
RPMI 1640 medium med glutamin og natriumkarbonat (PAA E15-840)	PAA Laboratories, Pasching, Australia
SDS, natriumlaurylsulfat (161-0301)	Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA
Simvastatin (S485000)	Toronto Research Chemicals (TRC), North York, Ontario, Canada
Simvastatin hydroksy-syre (S485020)	Toronto Research Chemicals (TRC), North York, Ontario, Canada
TEMED (161-0800)	Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA
Tris (base),(T1503)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Tween <sup>®</sup> 20 (170-6531)	Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA
Z-Ala-Ala-Asn-NHMec, legumainsubstrat	Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK
Z-Arg-Arg-AMC, cathepsin B substrat (I-1135)	Bachem, Bubendorf, Sveits
Z-Phe-Arg-NHMec, cathepsin L substrat	Bachem, Bubendorf, Sveits

## 2.2 Utstyr

Utstyr	Leverandør
Class II type A2 LAF-benk	Esco, Singapore
Corning 75 cm <sup>2</sup> dyrkningsflaske (3275)	Corning, NY, USA

Costar 6-brønners brett (3506)	Corning, NY, USA
Costar 96-brønners mikrotiterplate, svart (3915)	Corning, NY, USA
Countess automated cell counter	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Dri-Block DB-2A	Techne, Cambridge, Storbritannia
ECL Semi-dry Blotters, blottemaskin	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Storbritannia
Hoefer <sup>®</sup> (Automated Gel Stainer)	Pharmacia Biotech, NY, USA
Holten Lamin Air LAF-benk	Medinor, Oslo, Norge
Inkubatorskap (modell 3548)	Forma Scientific, Ohio, USA
Kodak <sup>®</sup> Biomax MS Film (Z363073-50EA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Nunc 96-brønners mikrotiterplate (260836)	Nunc, Roskilde, Danmark
NUPAGE <sup>®</sup> (4-12 % Bis-Tris Gel)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Olympus CKX41 lysmikroskop	Olympus, Tokyo, Japan
Universal 32 R sentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Tyskland
Wallac 1420 Victor3 Multilabel counter, mikropateleser	Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA

## 2.3 Celledyrking

### 2.3.1 RAW 264,7 celler

RAW 264,7 (American Type Culture Collection, ATCC; TIB-71) er en adherent makrofaglignende cellelinje fra mus (*Mus musculus*). Cellelinjen stammer fra svulst som er indusert med "Abelson murine leukemia virus". Cellene fikk passasjennummer som forteller hvor mange ganger cellene ble splittet. I forsøket ble det brukt celler med passasjennummer 3-16. Alt arbeid ble utført i LAF-benk med aseptisk arbeidsteknikk.

#### *Tining av celler*

Cellene var lagret i flytende nitrogen i dyrkingsmedium tilsatt 5 % DMSO. Cellebeholderen ble tatt ut og tint ved forsiktig omvending i vannbad ved 37 °C i cirka 40-60 sekunder, og

deretter desinfisert med 70 % etanol. Elleve ml av dykningsmedium ble tilsatt til en corning 75 cm<sup>2</sup> dykningsflaske og det tinte cellematerialet ble overført til flasken. Dykningsmedium ble skiftet neste dagen, for å fjerne rester av DMSO.

### *Dyrking av cellelinjen*

Dyrkingsmediumet bestod av Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) med 4 mM L-glutamin, 4,5 g/L glukose, 25 mM HEPES buffer, 1,5 g/L natriumbikarbonat og 10 % (v/v) føtalt bovinserum (FBS gold), 100 U/ml penicillin og 100 µg/ml streptomycin. Nytt dyrkingsmedium ble tilsatt ca. hver 3. dag. Cellene ble inkubert ved 37 °C og 5 % karbondioksid (CO<sub>2</sub>).

### *Splitting og telling av celler*

Splitting ble foretatt en gang i uke. Dyrkingsmedium ble fjernet og 12 ml nytt medium ble varmet i 37°C vannbad og tilsatt. Celleskraper ble brukt for å løsne cellene. Cellene ble kontrollert i mikroskop for fravær av klumper før overføring til 50 ml rør. I tilfelle cellene var klumpete, ble det brukt 1 ml pipette til å overføre 1 ml av gangen til et nytt 50 ml rør.

Cellekonsentrasjon ble målt ved at 10 µl av cellesuspensjonen og 10 µl tryptanblått ble blandet i et 1,5 ml eppendorfrør og deretter ble cellene telt ved hjelp av Countess celleteller. Resultatet ble gitt som antall levende celler, antall døde celler, % viabilitet og total antall celler.

## **2.3.2 Isolering av humane primære monocytter**

Fem rør (vacutainer SST) med ca. 9 ml fullblod per rør ble tappet fra bloddonor for å lage serum. Etter 30 minutter ble rørene sentrifugert ved 1300 G i 10 min ved romtemperatur og serumet ble samlet i 50 ml rør.

På tilsvarende måte ble 6 rør (vacutainer CPT) med ca. 7 ml fullblod per rør tappet fra samme donor. Rørene ble sentrifugert med en gang ved 1720 G i 30 minutter ved romtemperatur. Etter sentrifugering ble rørene vendt forsiktig noen ganger for å resuspendere cellesuspensjonen. Deretter ble cellesuspensjon overført til et 50 ml rør og cellene telt med Countess celleteller, før sentrifugering ved 350 G i 10 minutter. Cellepelleten ble resuspendert i 13 ml dyrkingsmedium, som inneholdt 20 % humant homologt serum (laget på forhånd). Cellesuspensjonen ble fordelt i to 6-brønners brett og inkubert i 3 timer. Etter 3 timer ble løse celler (lymfocytter) fjernet ved avpippetering av



dyrkingsmedium og tilsetning av nytt. Deretter ble cellene inkubert over natt ved 37°C og 5 % CO<sub>2</sub>.

### 2.3.3 Tillaging av statin-oppløsninger

En stockløsning (0,5 mg/ml i metanol) av simva-/atorvastatin ble dampet inn under nitrogen og fortynnet med dyrkingsmedium (Tabell 2.1). Dyrkingsmedium ble fjernet fra cellebrønnene før tilsetning av et nytt medium med ulike konsentrasjoner av statiner. Cellene ble stimulert både med lakton- og syreformen av simva-/atorvastatin.

**Tabell 2.1:** Oversikt over tillaging av de ulike konsentrasjoner av lakton- og syreformen av simva-/atorvastatin.

		Stock-løsning(0,5 mg/ml) som ble fordampet i nitrogen (ml)	DMSO (µl)	Dyrkingsmedium (ml)	Dyrkingsmedium med 0,5 % DMSO (ml)	Tilsatt	Sluttkonsentrasjon
Atorvastatin-lakton	A	1,08	25	5			200 µM
	B	0,54	25	5			100 µM
	C				4,5	0,5 ml av (B)	10 µM
	D				4,5	0,5 ml av (C)	1 µM
	E				4,5	0,5 ml av (D)	0,1 µM
Atorvastatin-syre	F	1,154		5			200 µM
	G	0,577		5			100 µM
	H			4,5		0,5 ml av (G)	10 µM
	I			4,5		0,5 ml av (H)	1 µM
	J			4,5		0,5ml av (I)	0,1 µM
Simvastatin-lakton	K	0,906	25	5			200 µM
	L	0,453	25	5			100 µM
	M				4,5	0,5 ml av (L)	10 µM
	N				4,5	0,5 ml av (O)	1 µM
	O				4,5	0,5 ml av (P)	0,1 µM
Simvastatin-syre	P	0,838		5			200 µM
	Q	0,419		5			100 µM
	R			4,5		0,5 ml av (S)	10 µM
	S			4,5		0,5 ml av (T)	1 µM
	T			4,5		0,5 ml av (U)	0,1 µM

### 2.3.4 Høsting av celler

Dyrkingsmediet ble enten sugd av og kastet eller tatt vare på, avhengig av hva som skulle analyseres. Cellene ble vasket med 1 ml PBS (Appendiks), og 500 µl av lysisbuffer

(Appendiks) ble tilsatt. Etter at cellene var lysert, ble de overført til eppendorfrør og lysatene ble frosset ved minus 70 °C og tint ved 30 °C 3 ganger. Deretter ble cellelysaten sentrifugert ved 10 000 G i 5 minutter og 4 °C. Supernatanten ble avpipettert og overført til nye eppendorfrør.

Ved høsting av ikke-adherente primære monocytter, ble dyrkingsmediet med løse celler sentrifugert ved 1000 G i 5 minutter og 4 °C før dyrkingsmediet ble sugd av og kastet. Deretter ble cellepelletten vasket med 1 ml PBS og tilsatt 250 µl lysisbuffer.

I eksperimenter for zymografi ble serumfritt dyrkingsmedium brukt i siste gangs stimulering før høsting, og dyrkingsmediet ble sentrifugert på samme måte som ble beskrevet over (1000 G i 5 minutter og 4 °C) og overført til nye rør.

## 2.4 Enzymaktivetsmåling

### 2.4.1 Legumainaktivitet

For å måle legumainaktivitet i cellelysaten, ble det brukt en metode som beskrevet i Chen *et al.* [35] og Johansen *et al.* [47]. Prøvene ble fortynnet i legumainassaybuffer (Appendiks). Bufferen inneholdt reduksjonsmiddel (DTT; 1 mM) som gjorde at cysteinproteinaser ble aktive. Det ble tilsatt et fluorescerende substrat (Z-Ala-Ala-Asn-NHMec; 2,5 µM) som spaltes spesifikt av legumain, og økningen i fluorescens ble målt over tid i en mikrotiterplate. Legumain spaltet dette substratet slik at NH<sub>2</sub>Mec ble frigitt. NH<sub>2</sub>Mec gir fluorescens som er målbar ved 360 nm eksitasjon og 460 nm emisjon.

Tjue µl av prøve og blindprøve ble tilsatt i triplikater i en 96-brønners svart mikrotiterplate. Temperaturen i mikroplateleseren ble innstilt til 30 °C. Deretter ble det tilsatt 100 µl legumainassaybuffer med 1 mM DTT til hver brønn. Etter tilsetning av reduksjonsmiddelet sto prøvene i minst 10 minutter, for å sikre aktivering av enzymet. Deretter ble det tilsatt 50 µL substratopløsning (Appendiks) rett før målingen.

### 2.4.2 Cathepsin B-aktivitet

Måling av cathepsin B-aktivitet ble gjennomført på samme måte som legumainaktivitet. Det ble brukt en metode som er beskrevet i Barrett *et al.* [66]. Prøven ble fortynnet i cathepsin B assaybuffer (Appendiks). Bufferen inneholdt reduksjonsmiddel (DTT; 8 mM), slik at

cysteinproteinase ble aktive. Etter aktivering ble det tilsatt et spesifikt fluorescerende substrat (Z-Arg-Arg-AMC; 68  $\mu$ M). Cathepsin B spalter substratet og gir fritt fluorescerende  $\text{NH}_2\text{Mec}$ , og økningen i fluorescens per sekund ble målt.

På tilsvarende måte som over (2.4.1) ble 20  $\mu$ l av prøven eller blindprøven tilsatt i triplikater mikrotiterplate. Temperaturen i mikroplateleseren ble innstilt til 30 °C. Hundre  $\mu$ l ”prøvebuffer” (Appendiks) ble tilsatt til hver brønn med 8 mM DTT.

### 2.4.3 Cathepsin L-aktivitet

Først ble 5  $\mu$ l av den spesifikke cathepsin B-hemmeren CA-074 (5  $\mu$ M) (Appendiks) tilsatt i en 96-brønners svart mikrotiterplate. Deretter ble det tilsatt 5  $\mu$ l av 100  $\mu$ M cathepsin L-inhibitor III som triplikat i 3 brønner og som kontroll 5  $\mu$ l av Brij (0,1 %) (Appendiks) i 3 brønner. Ti  $\mu$ l av prøven ble så tilsatt alle brønner. Temperaturen i mikroplateleseren ble innstilt til 28°C. I likhet med cathepsin B-aktivitetsmåling ble prøven fortynnet i cathepsin L-”prøvebuffer” (Appendiks), og bufferen inneholdt reduksjonsmiddel (DTT; 8 mM) som gjør at cysteinproteinase ble aktive. Etter tilsetning av reduksjonsmiddelet stod prøvene i minst 15 minutter. Umiddelbart før måling ble det tilsatt et fluorescerende substrat (Z-Phe-Arg-NHMec; 500  $\mu$ M) som spaltes av cathepsin L, slik at sluttvolum ble 200  $\mu$ l. Det ble målt kinetikk i 60 minutter og cathepsin L-aktivitet ble kalkulert som differansen mellom Brij (0,1 %) og cathepsin L-inhibitor III.

## 2.5 Totalproteinmåling

For å måle totalprotein ble det brukt en metode som er beskrevet av Bradford [67]. Prinsippet er basert på at når Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Coomassie-fargestoff) i en sur løsning bindes til protein, skjer det en endring i absorpsjonsmaksimum fra 465 nm til 595 nm. Absorbansen ble målt i mikroplateleser ved 595 nm. Albumin ble brukt som proteinstandard.

Standardversjon for mikrotiterplate (måleområde fra 50 til 300  $\mu$ g/ml totalprotein):

Bruksløsning av fargereagens ble laget ved at Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate fortynnes med vann (1:5). Ti mikroliter blindprøve, standard og prøve ble tilsatt som duplikater i en 96-brønnes mikrotiterplate. Temperaturen i mikroplateleseren ble stilt til 25 °C. To hundre  $\mu$ l bruksløsning av fargereagens ble tilsatt alle brønner. Etter 5 minutter

ble absorbansen målt og standardkurve med 50-300 µg/ml albumin ble brukt til å beregne totalproteinkonsentrasjonen i prøvene.

Mellom-versjon for mikrotiterplate (måleområde fra 0 til 150 µg/ml totalprotein): Noen av prøvene viste seg til å inneholde under 50 µg/ml, så for å få bedre deteksjon av disse ble det brukt en mellomversjon med standardkurve fra 0 til 150 µg/ml albumin. Metoden var som over, men istedenfor 10 µl ble det brukt 20 µl av blindprøve, standard og prøve.

## 2.6 Western blotting

Western blotting er en analytisk metode for å detektere proteiner i prøver ved hjelp av antistoffer og gelelektroforese. Proteinene ble separert med hensyn til molekylvekt, slik at proteiner med lav molekylvekt vandrer lengst ned i gelen. Deretter ble proteinene overført til en membran, der de ble detektert ved hjelp av antistoff. Membranen ble inkubert med primærantistoff som binder seg med det ønskede proteinet og dagen etter ble sekundært antistoff tilsatt, som binder seg til primærantistoffet. Deretter ble membranen framkalt ved hjelp av "ECL<sup>TM</sup> Blotting Detection Reagents".

Cellelysat ble oppkonsentrert ved hjelp av aceton-felling (Appendiks). Femten µl av totalprotein ble applisert per brønn i 15 brønner og proteinene ble separert i gelen (4-12 % Bis-Tris Gel) ved hjelp av elektroforesen (200 V i ca. 1,5 time). Deretter ble proteinene overført til membranen med blottemaskin og tilsatt primærantistoff. Neste dag ble membranen inkubert med sekundærantistoff i 1 time og fremkalt i mørkerom.

## 2.7 Zymografi

Zymografi er en metode som blir brukt til å detektere og karakterisere metalloproteinaser, kollagenaser og andre proteaser som kan utnytte gelatin som et substrat. Etter farging med Coomassieblått, oppstår det klare bånd i gelen der proteasene har brudd ned gelatin.

Reagenser for separerende gel ble blandet (Appendiks) godt og tilsatt i støpeformen. Etter 1 time ble reagenser til konsentrerende gel blandet (Appendiks) og tilsatt, og kammen ble plassert. Prøvene ble fortynnet med "sample"buffer (Appendiks) til ønsket konsentrasjon og 20 µl av blandingen ble tilsatt på stivnet gelen. Elektroforese ble brukt på tilsvarende måte som Western blotting med 200 V i ca. 1,5 time. Deretter ble gelen vasket 2 ganger 30

minutter med 2,5 % triton-x (Appendiks) og inkubert med inkuberingbuffer (Appendiks) over natt i 37°C. Dagen etter ble gelen farget med Coomassieblått med automatiske fargemaskin.

## 2.8 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Totalmengden av både aktiv og proform av legumain ble målt med ELISA ved hjelp av "Human Total Legumain DuoSet" (DY 4769, R&D systems)-kit. Leverandørens protokoll ble fulgt: Hundre µl av fortynnet primærantistoff ("Capture Antibody") ble tilsatt i en 96-brønnes mikrotiterplate og inkubert over natt. Etter 3 ganger vasking med 400 µl vaskebuffer (Appendiks), ble 300 µl "Reagent Dilution" (RD) tilsatt brønnene. Deretter ble det venting i 1 time og før hver tilsetting ble det vasket med vaskebuffer. Hundre µl av prøve eller standard fortynnet i RD ble tilsatt før inkubering i 2 timer. Sekundærantistoff ("Detection antibody") fortynnet i RD ble tilsatt til hver brønn og etter enda 2 timers inkubering ble 100 µl fortynnet streptavidin-HRP tilsatt. Deretter ble 100 µl substratløsning tilsatt alle brønnene og inkubert i 20 minutter. Tilslutt ble 50 µl stoppløsning tilsatt før umiddelbar måling ved 450 nm absorbans.

## 2.9 Statistiske analyser

I denne oppgaven ble brukt tre ulike statistiske metoder; lineær regresjonsanalyse, Mann-Whitney test og Wilcoxon test. Lineær regresjonsanalyse ble det brukt der observasjoner viste tilnærmet lineær sammenheng. Nullhypotesen er formulert som ingen stigning eller reduksjon i stigningslinjen (stigningstall=0) og alternative hypotesen er formulert som at stigningstallet er forskjell fra 0 (stigningstall  $\neq$  0). Nullhypotesen ble forkastet ved p-verdi mindre enn signifikansnivå ( $p < 0,05$ ). I tillegg ble den gjennomsnittlig kalkulererte konsentrasjon som hemmer halve enzymaktiviteten ( $IC_{50}$ ), beregnet fra de 3 parallelle forsøkene.

Mann-Whitney test er en ikke-parametrisk test som ble brukt for å sammenligne to uavhengige prøver av observasjoner. I denne oppgaven ble det brukt til å sammenligne om behandling med syre- eller laktonformen av statiner var signifikant forskjellige ( $p < 0,05$ ) ved en bestemt konsentrasjon. I tillegg ble det brukt Wilcoxon test som også er en ikke-parametrisk metode og som brukes til å sammenligne differansen mellom parobservasjoner.

---

Denne testen ble brukt til å bestemme om differansen mellom kontroll og en bestemt statinkonsentrasjon var signifikant ( $p < 0,05$ ).

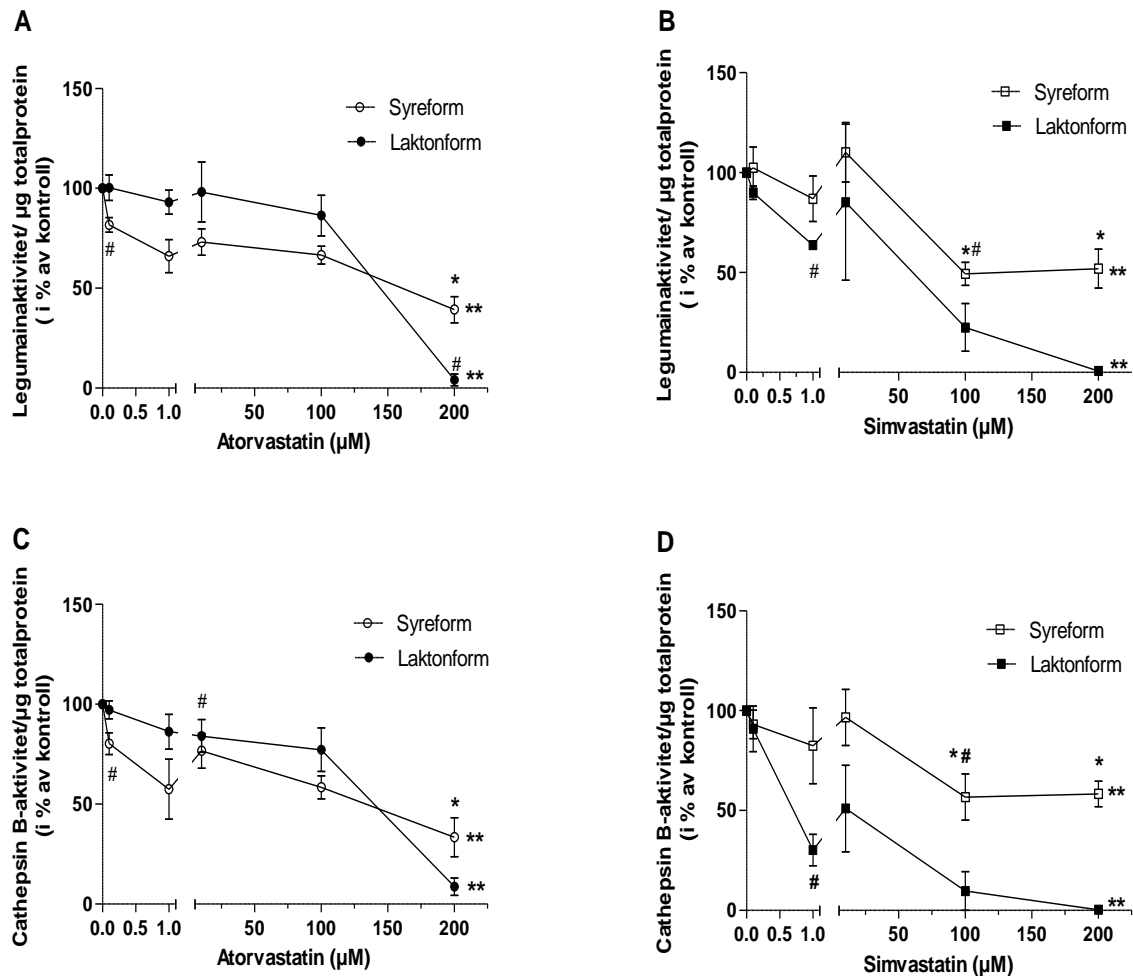
### 3. Resultater

#### 3.1 Atorva- og simvastatin hemmer legumain- og cathepsin B-aktivitet i RAW 264,7 celler.

Tidligere studier har vist at legumain mRNA-uttrykket øker i ustabile i forhold til stabile aterosklerotiske plakk, og at statiner har nedregulerende effekt [46, 62]. Det var derfor ønskelig å undersøke om statiner (atorva- og simvastatin) også har effekt på legumainaktivitet i RAW 264,7 makrofager. I tillegg ble aktivitet av cathepsin B undersøkt, for å studere nærmere om dette var en spesifikk legumaineffekt eller en generell effekt på lysosomale enzymer.

Legumainaktiviteten (legumainaktivitet/ $\mu\text{g}$  totalprotein) ble klart redusert både med syreform (stigningstall:  $-0,20 \pm 0,04$ ;  $p=0,0003$ , lineær regresjonsanalyse) og laktonform (stigningstall:  $-0,43 \pm 0,06$ ;  $p<0,0001$ ) med økende konsentrasjon av atorvastatin (Fig 3-1A). Det ble observert en signifikant reduksjon ( $p=0,0313$ ; ikke normaliserte data) både for 200  $\mu\text{M}$  av laktonformen og 0,1  $\mu\text{M}$  av syreformen i forhold til kontroll. Den kalkulererte konsentrasjon som hemmer halve enzymaktiviteten ( $\text{IC}_{50}$ ) var 140  $\mu\text{M}$  for syreformen og 123  $\mu\text{M}$  for laktonformen (Tabell 3.1). Konsentrasjoner fra 10  $\mu\text{M}$  til 200  $\mu\text{M}$  av syreformen ga en legumainaktivitetsreduksjon på 34 %, mens tilsvarende konsentrasjoner av laktonformen ga 94 % reduksjon i legumainaktivitet. Dette kan indikere at ved høye doser har laktonformen mer hemmende effekt enn syreformen. I tillegg var det signifikant forskjell mellom atorvastatinformene ved 200  $\mu\text{M}$  ( $p=0,0022$ ), men ikke ved 100  $\mu\text{M}$ .

Cathepsin B-aktivitet ble målt i samme cellelysat og viste tilsvarende reduksjon med økende atorvastatinkonsentrasjon, både for syreform (stigningstall:  $-0,23 \pm 0,06$ ,  $P=0,0012$ ) og laktonform (stigningstall:  $-0,39 \pm 0,05$ ,  $P<0,0001$ ) (Fig 3-1C). Til forskjell fra legumainaktivitet viste cathepsin B-aktivitet en signifikant reduksjon ( $p=0,0313$ ) i forhold til kontroll ved 10  $\mu\text{M}$  av laktonformen og ved 0,1  $\mu\text{M}$  av syreformen. Det var en signifikant forskjell i cathepsin B-aktivitet mellom atorvastatinformene ved 200  $\mu\text{M}$ , og laktonformen hemmet mest ( $p=0,0260$ ).  $\text{IC}_{50}$ - verdien var 105  $\mu\text{M}$  både for syre- og laktonformen (Tabell 3.1).



**Figur 3-1: Legumain- og cathepsin B-aktivitet etter behandling av RAW 264,7 celler med ulike konsentrasjoner av atorva- eller simvastatin.** RAW 264,7 celler ( $2,5 \times 10^5$  celler) ble stimulert med atorva- eller simvastatin (0, 0,1, 1, 10, 100, 200 µM; syre- og laktonform) i 24 timer og cellelysaten ble målt for enzymaktivitet ved bruk av spesifikke fluorescerende substrater. Data viser gjennomsnittet av legumain- (A, B) og cathepsin B- (C,D) aktivitet ( $\Delta F/\text{sekund}$ ) i forhold til µg totalprotein og normalisert i forhold til kontroll (100 %)  $\pm$  SEM ( $n=3$  à 2 paralleller). \* indikerer  $p < 0,05$  mellom formene (Mann-Whitney test, ikke normaliserte data). # indikerer  $p < 0,05$  i forhold til kontroll (Wilcoxon test, ikke normaliserte data). \*\* indikerer  $p < 0,05$ ; lineær regresjonsanalyse.

I likhet med atorvastatin ble cellene behandlet med simvastatin og målt for legumain- og cathepsin B-aktivitet. Det var klar reduksjon av legumainaktiviteten både etter behandling med syreformen (stigningstall:  $-0,28 \pm 0,06$ ,  $p=0,0004$ ) og laktonformen (stigningstall:  $-0,46 \pm 0,09$ ,  $p=0,0001$ ) (Fig 3-1B). Både lakton- og syreformen viste signifikant



legumainaktivitetsreduksjon ved henholdsvis 1  $\mu\text{M}$  og 100  $\mu\text{M}$  ( $p=0,0313$ ; ikke normaliserte data). Den kalkulerte konsentrasjonen som hemmer halve enzymaktiviteten ( $\text{IC}_{50}$ ) var 156  $\mu\text{M}$  for syreformen og 27  $\mu\text{M}$  for laktonformen (Tabell 3.1), og dette tyder på at laktonformen har høyere potens i forhold til syreformen i å hemme legumain. Det ble observert en signifikant forskjell mellom syre- og laktonformen både ved 100  $\mu\text{M}$  ( $p=0,0087$ ) og 200  $\mu\text{M}$  ( $p=0,0043$ ).

Videre ble også cathepsin B-aktivitet målt fra samme cellelysatsat og det var en klar reduksjon i aktivitet etter behandling både med simvastatin syreformen (stigningstall:  $-0,20 \pm 0,06$ ;  $p=0,004$ ) og laktonformen (stigningstall:  $-0,38 \pm 0,1$ ;  $p=0,001$ ) (Fig 3-1D). Det var en signifikant cathepsin B-aktivitetsreduksjon både for lakton- og syreformen ved henholdsvis 1  $\mu\text{M}$  og 100  $\mu\text{M}$  i forhold til kontroll ( $p=0,0313$ ). I tillegg ble det observert en signifikant forskjell mellom formene både ved 100  $\mu\text{M}$  ( $p=0,0043$ ) og 200  $\mu\text{M}$  ( $p=0,0028$ ).  $\text{IC}_{50}$ -verdiene var 197  $\mu\text{M}$  for syreformen og 0,8  $\mu\text{M}$  for laktonformen av simvastatin (Tabell 3.1), og dette kan være indikasjon at laktonformen har også mer cathepsin B-aktivitet hemmende effekt enn syreform.

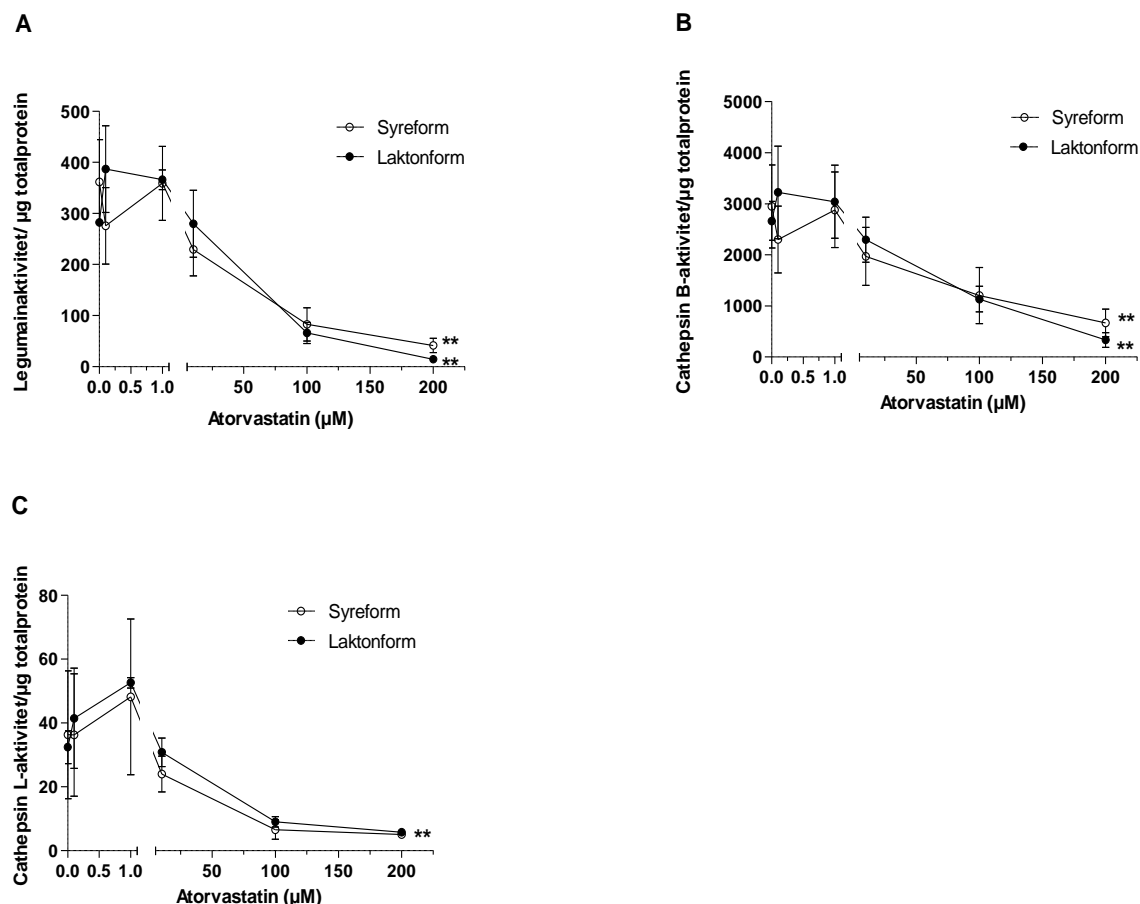
**Tabell 3.1:** Oversikt over den kalkulerte konsentrasjon av statin som hemmer halve enzymaktiviteten ( $\text{IC}_{50}$ ) av legumain, cathepsin B og L i to ulike celletyper.

<b>Kalkulert konsentrasjon av statin som hemmer halve enzymaktiviteten (<math>\text{IC}_{50}</math>)</b>					
<b>Celletype</b>	<b>Enzym</b>	<b>Atorvastatin</b>		<b>Simvastatin</b>	
		Syreform ( $\mu\text{M}$ )	Laktonform ( $\mu\text{M}$ )	Syreform ( $\mu\text{M}$ )	Laktonform ( $\mu\text{M}$ )
RAW 264,7 celler	Legumain	140	123	156	27
	Cathepsin B	105	105	197	0,8
Human primære monocytt	Legumain	20	44		
	Cathepsin B	41	55		
	Cathepsin L	38	56		

### 3.2 Atorvastatin hemmer legumain- , cathepsin B- og L-aktivitet i humane primære monocytter.

Siden statinene viste hemmende effekt på proteaseaktivitetene i en makrofag cellelinje (RAW 264,7; kap. 3.1), så var det ønskelig å undersøke om atorvastatin hadde tilsvarende effekt på primære monocytter/makrofager. Derfor ble det isolert primære humane monocytter fra fullblod, som ble stimulert til differensiering til makrofager etter inkubering med M-CSF, og disse ble deretter behandlet med ulike konsentrasjoner av syre- og laktonform av atorvastatin. I overensstemmelse med resultatene fra RAW 264,7 celler, viste primære humane monocytter en signifikant reduksjon i legumainaktivitet både etter behandling med syreform (stigningstall:  $-1,5 \pm 0,33$ ;  $p=0,0004$ , lineær regresjonsanalyse) og laktonform (stigningstall:  $-1,76 \pm 0,28$ ;  $p < 0,0001$ ) av atorvastatin (Fig 3-2A). På tilsvarende måte ble cathepsin B-aktiviteten signifikant redusert både med syreformen (stigningstall:  $-10,13 \pm 3,14$ ;  $p=0,005$ ) og laktonformen (stigningstall:  $-13,30 \pm 2,73$ ;  $p=0,0002$ ) i primære humane monocytter (Fig 3-2B).

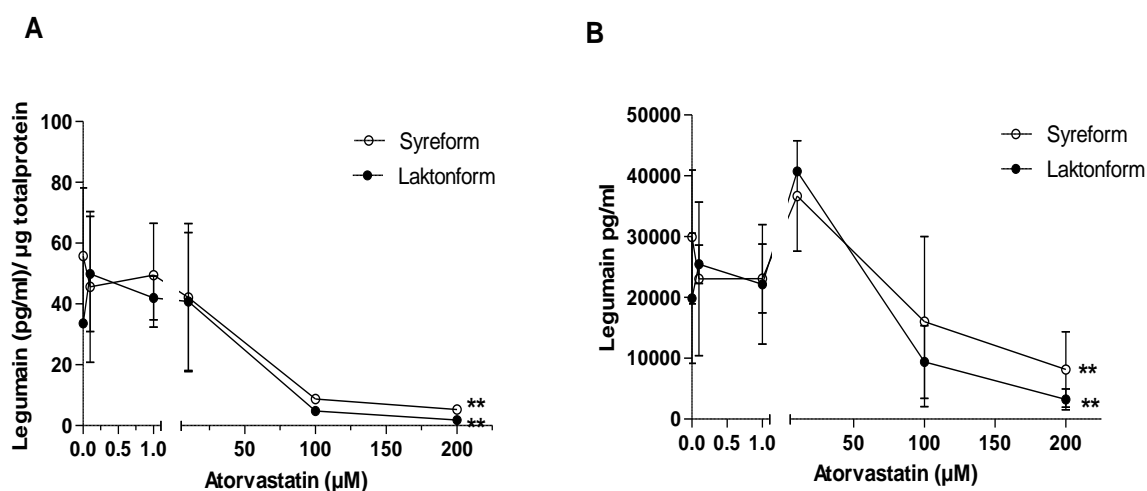
Syreformen hadde en kalkulert  $IC_{50}$ -verdi på  $20 \mu M$  og  $41 \mu M$  for henholdsvis legumain og cathepsin B, og laktonformen hadde tilsvarende verdier på  $44 \mu M$  og  $55 \mu M$  (Tabell 3.1). Dette kan tyde på at atorvastatin har en kraftigere hemmende effekt på legumainaktivitet enn på cathepsin B-aktivitet. Fra  $10$ - $200 \mu M$  viste laktonformen en reduksjon i legumainaktivitet på 95 %, mens syreformen viste reduksjon på 53 %. Cathepsin L-aktivitet ble også målt i lysatene fra humane primære monocytter behandlet med ulike konsentrasjoner og former av atorvastatin. Det var en klar aktivitetsreduksjon både med syreform (stigningstall:  $-0,18 \pm 0,07$ ;  $p=0,0329$ , lineær regresjonsanalyse) og laktonform (stigningstall:  $-0,19 \pm 0,05$ ;  $p=0,0019$ ) av atorvastatin (Fig 3-2C).  $IC_{50}$  for syreformen var  $38 \mu M$  og  $56 \mu M$  for laktonformen (Tabell 3.1).



**Figur 3-2: Legumain- (A), cathepsin B- (B) og L- (C) aktivitet etter behandling av humane primære monocytter med ulike konsentrasjoner av atorvastatin.** Isolerte humane primære monocytter ble stimulert med 100 ng/ml M-CSF i 3 dager før inkubering i 3 dager med atorvastatin (0, 0,1, 1, 10, 100, 200 µM; syre- og laktonform). Cellelysaten ble målt for enzymaktivitet ved bruk av spesifikke fluorescerende substrater og data viser gjennomsnittet av aktivitet ( $\Delta F/\text{sekund}$ ) i forhold til µg totalprotein  $\pm$  SEM ( $n=1-3$  à 2 paralleller). \*\* indikerer  $P<0,05$  lineær regresjonsanalyse

For å studere om atorvastatin hadde effekt på proteinmengden av legumain ble både cellelysat og kondisjonert medium målt med et spesifikt "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA). Humane primære monocytter behandlet med ulike konsentrasjoner av atorvastatin viste en klar reduksjon av legumainmengden i cellelysaten både for syreformen (stigningstall:  $-0,25 \pm 0,09$ ;  $p=0,020$ , lineær regresjonsanalyse) og laktonformen (stigningstall:  $-0,24 \pm 0,06$ ;  $p=0,0033$ ) (Fig 3-3A). Ved 100 µM var legumainmengden redusert 86-88 % for begge formene. I tillegg ble kondisjonert medium målt for legumain, og

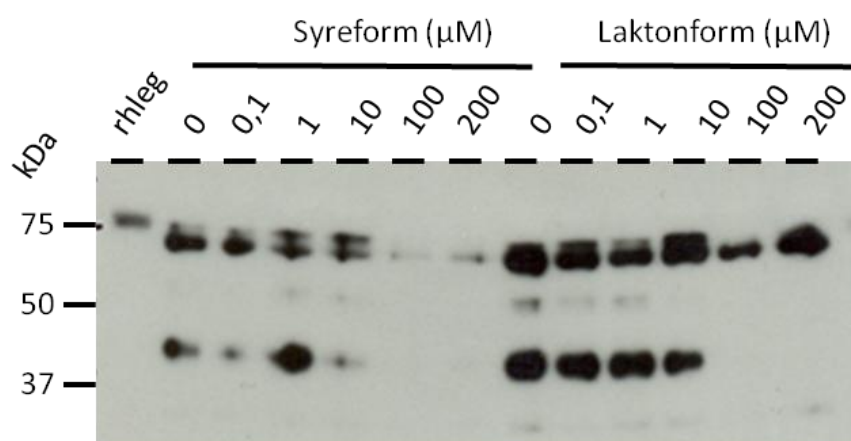
det ble observert en signifikant reduksjon i legumainmengden både for syreformen (stigningstall:  $-102,3 \pm 36,92$ ;  $p = 0,0197$ , lineær regresjonsanalyse) og laktonformen (stigningstall:  $-125,1 \pm 36,68$ ;  $p = 0,0067$ ) (Fig 3-3B). ELISA ble også utført på kondisjonert medium fra atorva- og simvastatin-behandlede RAW 264,7 celler, men dette ga veldig lave verdier, sannsynligvis pga speciesforskjeller (data ikke vist,  $n = 1$ ).



**Figur 3-3: Konsentrasjon av legumain i cellelysatsat (A) og kondisjonert medium (B) etter behandling av humane primære monocytter med atorvastatin.** Isolerte humane primære monocytter ble stimulert med 100 ng/ml M-CSF i 3 dager før inkubering i 3 dager med atorvastatin (0, 0,1, 1, 10, 100, 200 µM; syre- og laktonform). Legumain ble målt ved hjelp av ELISA og data viser legumain (pg/ml; B, kondisjonert medium) i forhold til µg totalprotein (A, cellelysatsat;  $n = 2$  à 1 parallell). \*\* indikerer  $P < 0,05$ , lineær regresjonsanalyse.

I tillegg ble Western blotting brukt for å ytterligere undersøke atorvastatin-effekten på proteinuttrykket av legumain i primære humane monocytter. Western blotting viste to legumainbånd, et på litt over 37 kDa og et under 75 kDa, i forhold til molekylvektstandardene (Fig 3-5). Det største proteinbåndet (delvis dobbeltbånd) var synlig på alle konsentrasjoner av både syre- og laktonform, men båndet var veldig svakt for 100 og 200 µM av syreformen. Båndet som lå over 37 kDa var ikke synlig ved 100 og 200 µM av begge formene og samsvarer med aktivitetsmålingene (Fig. 3-2A) som den aktive formen.

Som kontroll ble det brukt rekombinant prolegumain (rhLeg) og størrelsen på dette båndet indikerer at det båndet som lå under 75 kDa er proformen av legumain.

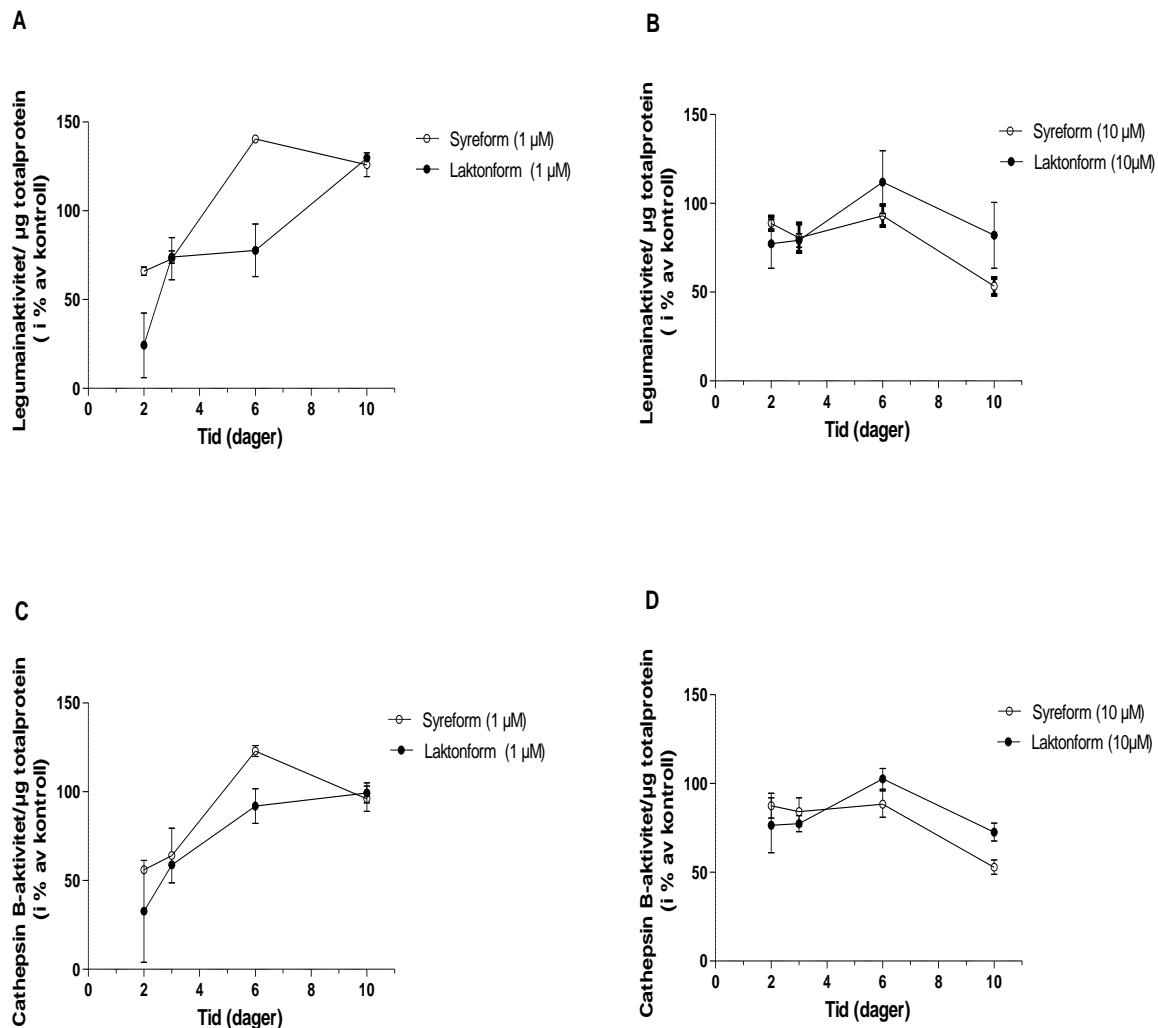


**Figur 3-4: Western blott av legumain etter behandling av differensierte humane primære monocytyter med ulike konsentrasjoner av atorvastatin.** Isolerte humane primære monocytyter ble stimulert med 100 ng/ml M-CSF i 3 dager før inkubering i 3 dager med atorvastatin (0, 0,1, 1, 10, 100, 200 µM; syre- og laktonform). Cellelysaten ble oppkonsentrert ved aceton-felling og 15 µg totalprotein ble applisert i hver brønn, og blottet ble analysert ved hjelp av et legumainspesifikt antistoff (n=2).

### 3.3 Tidsrespons av atorvastatin på legumain- og cathepsin B-aktivitet i RAW 264,7 celler.

Videre var det ønskelig å undersøke effekten av statiner over en tidsperiode, og derfor ble RAW 264,7 celler behandlet med henholdsvis 1 eller 10 µM av begge former av atorvastatin i 2, 3, 6 og 10 dager, før legumain- og cathepsin B-aktivitet ble målt i cellelysaten (Figur 3-6). Både syre- og laktonformen viste variasjoner i legumainaktivitet ved de forskjellige tidspunktene for både 1 µM og 10 µM atorvastatin (Fig 3-6A og B). Cathepsin B-aktiviteten målt i de samme cellelysaten viste lignende resultater som for legumain (Fig 3-6C og D). Generelt ser det ut at legumain- og cathepsin B-aktivitet øker med 1 µM av atorvastatin, mens aktiviteten ikke er endret veldig mye med 10 µM. I tillegg viser det generelt at det er

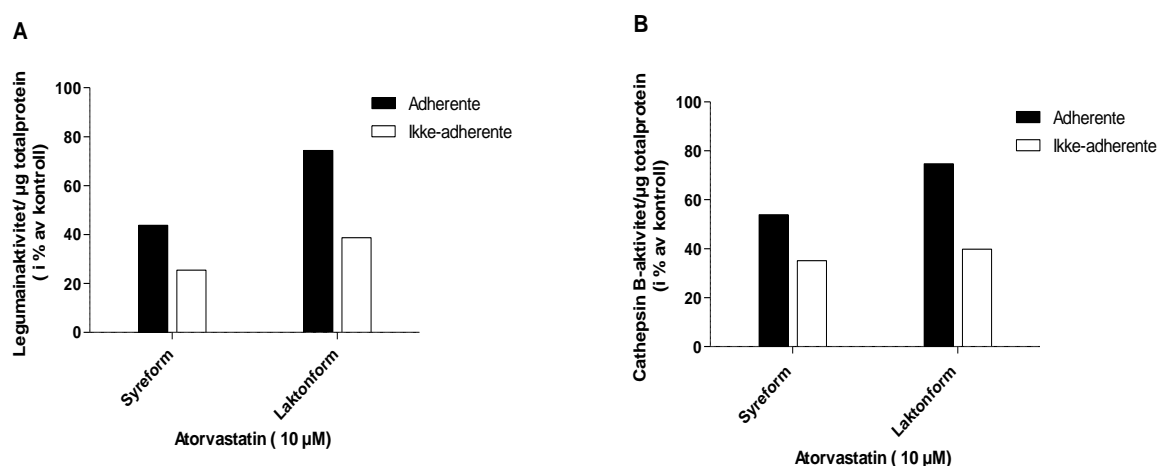
en aktivitetsøking frem til dag 6 og at aktiviteten deretter holder seg eller reduserer til dag 10.



**Figur 3-6: Legumain- (A, B) og cathepsin B- (C,D) aktivitet etter behandling av RAW 264,7 celler med 1 eller 10 µM atorvastatin i 10 dager.** RAW 264,7 celler ( $0,5-2,5 \times 10^5$  celler) ble stimulert med enten 1 µM (A, C) eller 10 µM (B, D) av atorvastatin (syre- og laktonform) i 2, 3, 6 og 10 dager og cellelysateene ble målt for enzymaktivitet ved bruk av spesifikke fluorescerende substrater. Data viser gjennomsnittet av proteaseaktivitet ( $\Delta F/\text{sekund}$ ) i forhold til µg totalprotein og normalisert i forhold til kontroll (100 %)  $\pm$  SEM ( $n=2-4$  à 2 paralleller).

Ved dag 10 ble det observert flere ikke-adherente celler og for å sammenligne legumainaktiviteten i disse med aktiviteten i de adherente cellene, så ble også ikke-adherente (løse) celler isolert, lysert og legumainaktivitet målt. Legumainaktiviteten var høyere i

adherente i forhold til ikke-adherente celler for begge atorvastatinformer (Fig. 3-7A). Syreformen ga 44 % legumainaktivitet i adherente celler i forhold til ustimulert kontroll, mens ikke-adherente celler viste 25 % aktivitet. Tilsvarende viste laktonform at adherente celler hadde 74 % og ikke-adherente celler hadde 39 % legumainaktivitet. Cathepsin B-aktiviteten vist lignende resultater ved at syre- og laktonformen hadde henholdsvis høyere aktivitet i adherente (54 % og 75 %) enn ikke-adherente (35 % og 40 %) celler i forhold til kontroll (Fig 3-7B).

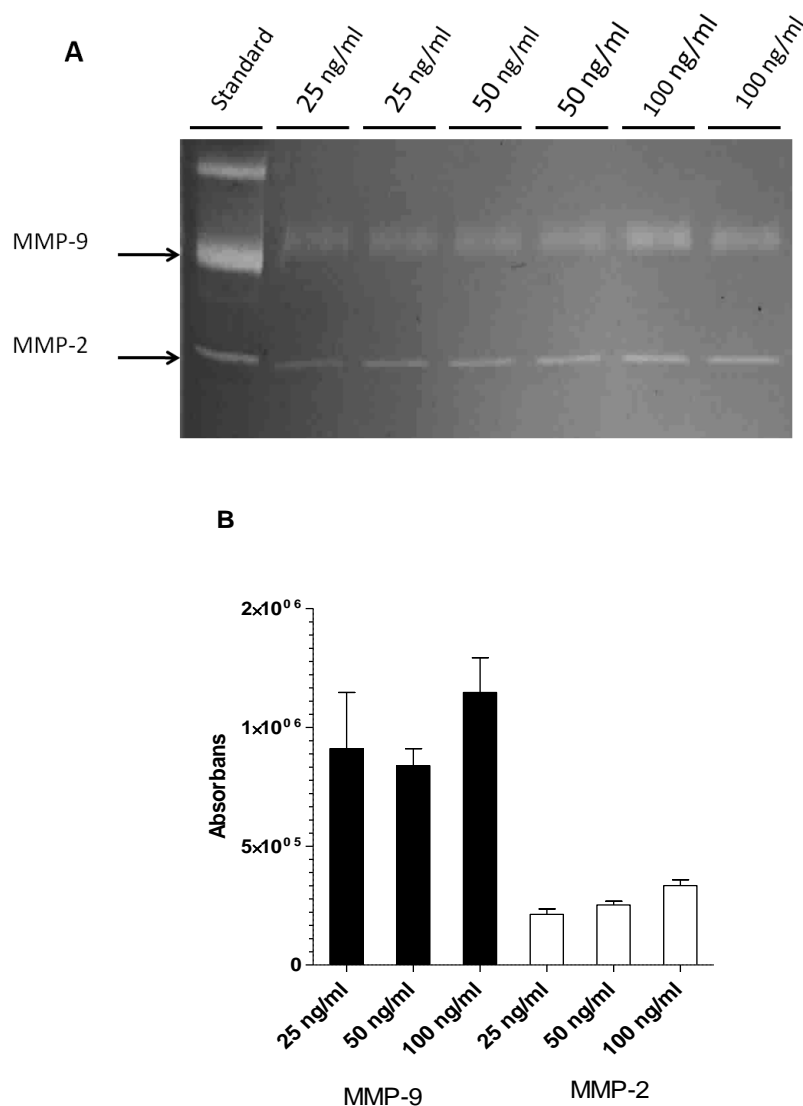


**Figur 3-7: Legumain- (A) og cathepsin B- (B) aktivitet etter behandling av RAW 264,7 celler med 10 μM atorvastatin i 10 dager.** RAW 264,7 celler ( $5 \times 10^5$  celler) ble stimulert med 10 μM atorvastatin (syre- og laktonform) i 10 dager. Både adherente og løse celler i mediet ble høstet og cellelysaten ble analysert for enzymaktivitet ved bruk av spesifikke fluorescerende substrater. Data viser gjennomsnittet av enzymaktivitet ( $\Delta F/\text{sekund}$ ) i forhold til μg totalprotein og normalisert i forhold til kontroll (100 %) ( $n=1$  à 2 paralleller)

### 3.4 Effekt av RANKL og atorvastatin på MMP-2 og -9 i RAW 264,7 celler.

Tidligere studier har vist at 50 ng/ml RANKL (”receptor activator of nuclear factor-κB ligand”) stimulerer MMP-9-uttrykket i RAW 264,7 celler [68]. I dette forsøket ble RAW 264,7 celler stimulert med ulike konsentrasjoner av RANKL (25, 50, 100 ng/ml) og ved hjelp av zymografi ble MMP-2 og -9 analysert. Zymografigelen viste at både MMP-2 og -

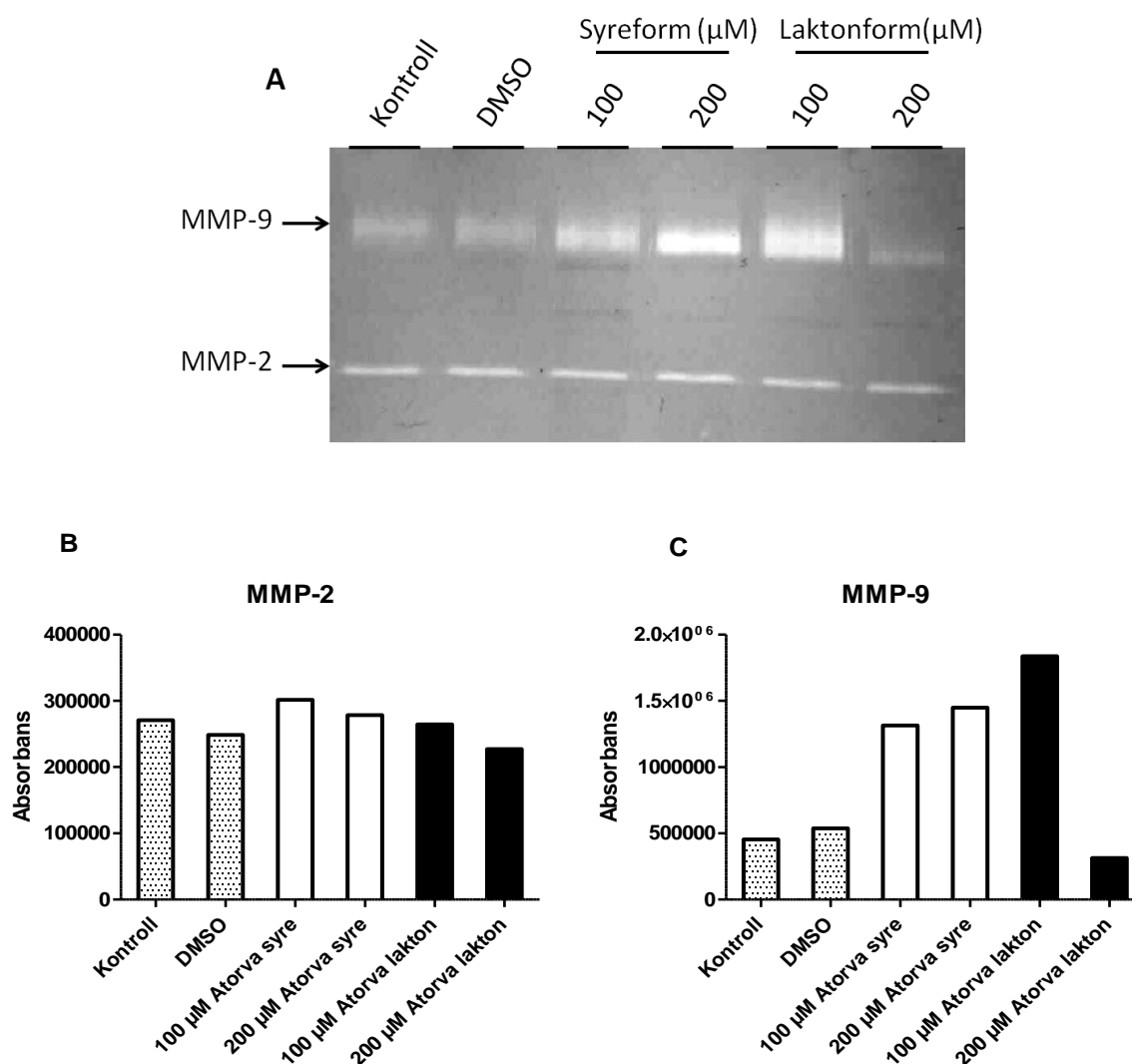
9 var til stede i kondisjonert medium (Fig 3-8A). Ulike konsentrasjoner av RANKL så ikke ut til å endre mengden av MMP-er utskilt, men cellene så ut til å skille ut mer MMP-9 enn MMP-2 i forhold til den visuelle styrken på zymografibåndene. Intensiteten av MMP-båndene ble målt ved absorbans og mengden av enzymene korrelert, som bekreftet at cellene skilte ut mer MMP-9 enn MMP-2 (Fig 3-8B). I tillegg ble både legumain- og cathepsin B-aktivitet målt i cellelysatsene for å se om RANKL hadde effekt på disse enzymene, men det ble ikke observert noen effekt av RANKL ved de konsentrasjonene som ble brukt i denne oppgaven (data ikke vist, n=1).



**Figur 3-8: Zymografi av MMP-2 og -9 (A) og kvantifisering av gelbåndene (B) etter behandling av RAW 264,7 celler med RANKL i 4 dager.** RAW 264,7 celler ( $1 \times 10^6$  celler) ble stimulert med RANKL (25, 50 eller 100 ng/ml) i 4 dager. Tjue  $\mu$ l av kondisjonert medium med samplebuffer ble applisert i hver brønn. Standard = Humant blod (n=1 à 2 paralleller).



Videre ble cellene stimulert med RANKL (50 ng/ml) i 4 dager og deretter behandlet med atorvastatin (100 eller 200  $\mu\text{M}$ ) i 24 timer, for å undersøke om statiner har effekt på MMP-2 og -9. Begge de proteolytisk MMP-enzymene dannet klare bånd i gelen (Fig 3-9A).



**Figur 3-9: Zymografi av MMP-2 og -9 (A) og kvantifisering av MMP-2 (B) og -9 (C) i atorvastatin-behandlede RAW 264,7 celler.** RAW 264,7 celler ( $1 \times 10^6$  celler) ble stimulert med RANKL (50 ng/ml) i 4 dager før de ble behandlet med 100 eller 200  $\mu\text{M}$  av atorvastatin (atorva; syre- og laktonform) i 24 timer. Tjue  $\mu\text{l}$  av kondisjonert medium med samplebuffer ble applisert i hver brønn. Kontroll = atorva-syre-ustimulerte celler; DMSO = atorva-lakton-ustimulerte celler, 0,5 % DMSO ( $n=1$ ).

---

I tillegg ble intensiteten av båndene kvantifisert, og for MMP-2 viste begge formene av atorvastatin ikke ga noen effekt i forhold til kontroll (Fig 3-9B). Derimot viste MMP-9 en variasjon, hvor begge formene av 100  $\mu$ M atorvastatin viste høyere MMP-9-aktivitet og/eller mengde enn kontroll (Fig 3-9C). Men når det gjaldt 200  $\mu$ M viste syreformen mer MMP-9, mens laktonformen viste en klar nedgang i MMP-9.

## 4. Diskusjon

Aterosklerose er en progressiv sykdom hvor lipider, ekstracellulær matriks og aktiverte vaskulære glattmuskelceller akkumuleres i arterieveggen, som fører til vekst av et aterosklerotisk plakk. Monocytt/makrofager spiller en viktig rolle både i begynnelsen og under utviklingen av aterosklerose og disse gir nye potensielle terapeutiske mål for forebygging og behandling av sykdommen. Monocytt migrerer til intima hvor de differensierer til makrofager, og tar opp oxLDL gjennom "scavenger" reseptorer og blir skumceller, som er begynnelsen på en plakkdannelse. Men fortsatt er det mange uløste spørsmål angående monocyttenes involvering i ulike stadier av aterosklerose-utviklingen, for eksempel i mekanismen av deres rekruttering, migrering og samspill med andre immunceller i et plakk [13, 62].

Legumain mRNA-uttrykket er økt i ustabile plakk i forhold til stabile plakk[46], men hvilke roller legumain spiller i aterosklerose er ennå ikke klarlagt. Noen substrater av legumain er involvert i aterosklerose, deriblant MMP-2, cathepsin B og L [25, 26, 51, 62]. Økning av legumain-uttrykket fører til økt bearbeiding av cathepsin L til aktiv form i ustabile aterosklerotiske plakk og i tillegg er cathepsin B og L involvert i nekrotiske kjernedannelse. Både cathepsiner og matriks metalloproteaser fremmer enzymatisk degradering av den fibrøse kappen [9, 30, 36]. I denne studien ble aktivitet av ulike proteaser undersøkt med hovedfokus på legumain og cathepsin B.

Stadig flere studier beviser at 3-hydroksy-3-metylglutaryl CoA (HMG-CoA) reduktasehemmere (statiner) reduserer LDL-nivået, og at det har betydelig klinisk nytte for pasienter med aterosklerose. I tillegg har statiner kolesterol-uavhengige effekter og det har vært stadig større oppmerksomhet på disse, blant annet at de reduserer uttrykket av MMP-2 og -9 [56, 62]. Selv om simva- og atorvastatin blir administrert som henholdsvis lakton-prodrug og aktiv syreform, blir de omdannet *in vivo* til likevekt mellom lakton- og syreform. Det var derfor viktig å undersøke effekten av begge formene av atorva- og simvastatin. For å undersøke nærmere aktivitet og/eller mengde av proteasene legumain, cathepsin B og L, MMP-2 og -9 etter behandling med statiner (atorva- og simvastatin), ble det brukt to ulike cellemodeller; RAW 264,7 celler og humane primære monocytter.

## 4.1 Cellemodeller og metoder

Monocytt/makrofager spiller en avgjørende rolle i inflammasjon og lipidmetabolisme i aterosklerose, og kan dermed påvirke plakkestabilitet. Monocytt/makrofager er et spesielt passende surrogat for aterosklerotisk vev for å studere effekten av statiner [62]. RAW 264,7 celler er en adherent makrofaglignende cellelinje fra mus og cellelinjen stammer fra svulst som er induisert med "Abelson murine leukemia virus" [69]. RAW 264,7 celler er blitt brukt som *in vitro* modell for humane makrofager i flere studier, for eksempel Lee *et al.* [26] og Fava *et al.* [68].

Legumain proteinuttrykket er vist til å øke signifikant i M-CSF ("macrophage colony-stimulating factor") differensierte humane monocytt i forhold til i ubehandlede monocytt [37]. I denne oppgaven ble humane primære monocytt brukt som etter stimulering med M-CSF blir til adherente makrofager. Makrofager uttrykker legumain, MMP-2 og -9, og cathepsin B og L [25, 26, 51, 62], dermed var cellemodellene egnet til å studere om statiner kan påvirke aktivitet av disse proteasene.

I denne oppgaven ble enzymaktivitet av legumain, cathepsin B og L målt ved hjelp av ulike peptidsubstrater. For å korrigere aktivitet med antall celler per prøve, ble enzymaktivitet delt med totalprotein i prøven. I noen av de forsøkene ble det til tider observert stor variasjoner i legumainaktivitet per µg totalprotein, og for å overkomme større spredningsvariasjoner i de forsøkene ble normaliserte data benyttet ved presentasjon av resultatet.

I tillegg ble det brukt to andre metoder som beskriver legumain kvalitativt og/eller kvantitativt; Western blotting og ELISA. ELISA er en følesom metode som forteller om totalmengden legumain uten å ta hensyn til proform eller aktiv form. Metoden er tidligere blitt brukt til å bevise at legumainmengden er høyere i ustabile plakk i forhold til i stabile i en studie av Mattock *et al* [36]. I likhet med enzymaktivitet ble også ELISA-måling av cellelysate delt med totalprotein i prøven. Western blotting er også tidligere blitt brukt for å bevise at legumain er til stede i aterosklerotiske plakk og i hvilke molekylformer [36].

## 4.2 Statiner hemmer legumain-, cathepsin B- og L-aktivitet

Det ble i denne oppgaven for første gang vist at økende konsentrasjoner av både syre- og laktonformene av statinene (atorva- og simvastatin) førte til reduksjon av både legumain- og

cathepsin B-aktivitet i cellelysat av RAW 264,7 celler. Selv om det ble observert en aktivitetsreduksjon ved de fleste konsentrasjonene, var det mest signifikant reduksjon ved de høyeste konsentrasjoner.

De høyeste konsentrasjonene (100 og 200  $\mu\text{M}$ ) av laktonformene for begge statinene, og spesielt simvastatin, viste mer legumainaktivitetsreduksjon enn syreformen. Den kalkulererte konsentrasjon som hemmer halve enzymaktiviteten ( $\text{IC}_{50}$ ) viste at lakton-simvastatin (27  $\mu\text{M}$ ) har høyere potens til å hemme legumain enn syreformen (156  $\mu\text{M}$ ). I en studie som ble gjort for å sammenligne toksisitet av ulike statiner i humane skjelettmuskelceller, har lakton-simvastatin vist mer celledrepende effekt enn lakton-atorvastatin og tilsvarende syreformene [58]. I tillegg viste studien at laktonformene er 1000 til 2000 ganger så lipofile sammenlignet med de respektive syreformene, og i tillegg ble det omtalt at en høyere passiv diffusjon av ikke-polar laktonform over membraner kan forklare større effekt av laktonformen. Dette er i samsvar med resultatene fra RAW 264,7 celler i denne oppgaven.

Et annet arbeid i vår forskningsgruppe har vist at legumainaktivitet også er redusert etter behandling av både syre- og laktonformen av atorva- og simvastatin i HEK ("Human embryonic kidney") 293 celler (Islam M. Yaseen, ikke-publiserte data). Siden enzymhemming er observert i flere celled modeller, forsterkes funnene i denne oppgaven om at statiner reduserer legumainaktiviteten. Siden simvastatin var mer toksisk [58] og at atorvastatin har vist at legumain mRNA-uttrykket nedreguleres i tidligere studier [62], ble de neste forsøkene utført kun med atorvastatin.

Cathepsin B er også vist å øke i ustabile sammenlignet med stabile plakk, hvor både proteinuttrykket og mRNA var økt [46]. I denne oppgave ble cathepsin B-aktivitet redusert med både syre- og laktonformene av atorva- og simvastatin i RAW 264,7 celler. Reduksjonen var mest signifikant ved høyeste konsentrasjoner av begge formene. Cathepsin B er et legumain-substrat [41], og figur 3-1 viser at legumain- og cathepsin B-aktivitet har samme reduksjonsmønster. Dette kan indikere at reduksjon i legumainaktivitet fører til reduksjon i cathepsin B-aktivering.

For å bekrefte at statiner har samme effekt på proteaseaktivitet i humane celler, ble humane primære monocytter behandlet med atorvastatin. Både legumain- og cathepsin B-aktivitet viste samme aktivitetsreduksjon i makrofager fra mennesket som fra mus. Legumain viste å ha lavere  $\text{IC}_{50}$  (20  $\mu\text{M}$  og 44  $\mu\text{M}$  i forhold til syre- og laktonformen) enn cathepsin B (41  $\mu\text{M}$

og 55  $\mu\text{M}$ ) i Human primære monocytter, som kan tyde på atorvastatin har kraftigere hemmingsevne på legumainaktivitet enn på cathepsin B-aktivitet. Dette ble ikke observert i RAW 264,7 celler, derfor trenger det flere forsøk for å bekrefte eller avkrefte dette.

Cellelysate målt med ELISA viste at atorvastatin reduserer totalmengden av legumain intracellulært og dette kan komme av at atorvastatin nedregulerer legumain mRNA-uttrykket som tidligere vist [62]. Tidligere studium har vist at proform av legumain blir skilt ut i kondisjonert medium fra M-CFS-behandlede humane makrofager, men ikke fra ubehandlede monocytter [37]. Måling av legumain i kondisjonert medium i denne oppgaven har vist at det er mye legumain som skilles ut ekstracellulært og utskillelsen er redusert signifikant etter stimulering med atorvastatin. Kondisjonert medium mangler korrigering for totalprotein, og dette kan være en av de grunnene at det er store variasjoner i resultatet. Denne oppgaven, i likhet med den tidligere studien [37], viser at differensierte makrofager uttrykker og skiller ut mye legumain.

Western blotting viste legumainbånd som ligger litt høyere i molekylvekt enn det skulle være for proformen (56 kDa) og tilsvarende med den aktive formen (36 kDa). I en tidligere studie ble det vist at ulike celletyper kan ha ulik molekylvekt på aktiv form av legumain [70]. I denne oppgave ble det brukt rekombinant prolegumain som kontroll, som ligger litt under 75 kDa. Ved behandling med høyere konsentrasjoner (100  $\mu\text{M}$  og 200  $\mu\text{M}$ ) av syre- eller laktonformen av atorvastatin reduseres mengden av legumain aktiv form. Generelt kan dette være en indikasjon på at høye konsentrasjoner atorvastatin hemmer aktivering av proform til aktiv form, men det må gjøres flere studier for å bekrefte eller avkrefte dette. Autokatalytisk aktivering av legumain fra proform (56 kDa) til aktiv form (46 kDa) er pH-avhengig og endring i pH kan hemme prosessen. I tillegg er det omtalt at ukjente proteaser kan være involvert i spalting av enzymet fra 46 kDa til 36 kDa [38], og direkte eller indirekte hemming av proteasene kan føre til hemming av prosessen.

I en tidligere studie ble det vist at legumain-uttrykket reduserer gradvis med langvarig terapi med atorvastatin [62]. Dermed var det ønskelig å undersøke om atorvastatin har samme effekt på legumainaktivitet over 10 dager. En annen tidligere studie har vist at administrasjon av 40 mg atorvastatin ga  $C_{\text{max}}$  (maksimum plasmakonsentrasjon) for syre- og laktonformen på henholdsvis  $\leq 67$  ng/ml (eller  $\leq 0,12$   $\mu\text{M}$ ) og (4,2 ng/ml (eller  $< 0,01$   $\mu\text{M}$ ). Tilsvarende 40 mg simvastatin ble administrert og ga 6,9 ng/ml (eller  $< 0,02$   $\mu\text{M}$ ) for syreformen og 3,2 ng/ml (eller  $< 0,01$   $\mu\text{M}$ ) for laktonformen [55]. I denne oppgaven ble det brukt syre- og

laktonformen av simva- og atorvastatin med konsentrasjoner 0,1, 1, 10, 100, 200  $\mu\text{M}$  og disse er langt høyere konsentrasjoner enn terapeutisk dose. Generelt brukes statiner over lang tid (år). I denne oppgaven ble korttidsbehandling med høyere doser observert, og korttidseffektene kan indikere om langtidseffekter vil oppstå med lave doser.

I denne oppgaven ble det vist store variasjoner av legumainaktivitet på de ulike tidspunktene og figur 3-6 viser generelt at legumainaktivitet øker frem til dag 6 og reduseres på dag 10. Dette kan kanskje forklares ved at etter dag 6 begynte cellene å vokse tett og over hverandre, som kan føre til at flere celler løsner. I tillegg viste RAW 264,7 adherente celler å ha høyere legumain- og cathepsin B-aktivitet enn ikke-adherente celler. Dette kan indikere at det er sammenheng mellom cellenes adherensegenskap og aktivering av de ulike proteasene i RAW 264,7 celler.

Det er antatt at cathepsin L-uttrykket kan være involvert i kollagen-degradering, nekrotisk kjernedannelse og brudd av aterosklerotisk plakk [52]. I denne oppgave ble det gjort et forsøk med cathepsin L-aktivitetsmåling etter at humane primære monocytter ble behandlet med atorvastatin og dette viste en signifikant reduksjon, men det var få forsøk til å trekke en konklusjon. Det er antatt at legumain bearbeider cathepsin L til dobbelkjedet aktiv form (25 kDa) og ikke til enkelkjedet aktiv form (30 kDa). Det er dobbelkjedet aktiv form som er til stede i ustabile plakk sammen med aktiv form av legumain (36 kDa). I tillegg er det vist at det er mer av 25 kDa cathepsin L i monocyttene som uttrykker mye legumain [36]. I denne oppgaven ble det observert samme reduksjonsmønster av legumain- og cathepsin L-aktivitet og dette kan indikere at reduksjon i legumainaktivitet også kan føre til reduksjon i cathepsin L-aktivitet.

En mulig mekanisme for effektene som ble observert i denne oppgaven kan komme av at statiner hemmer dannelsen av mevalonatmetabolitter, inkludert farnesylpyrofosfat og geranylgeranylpyrofosfat, som stimulerer prenylering av noen proteiner og slike prenylerte proteiner er involvert i en rekke cellulære prosesser. Man kan gjøre et kontrollforsøk for å undersøke om effektene av statinene på proteaseaktivitet og/eller -mengde skyldes for lite mevalonat i de statinstimulerte cellene pga HMG-CoA-reduktasehemming. Dette kan gjøres for eksempel ved at man tilsetter mevalonat til statinbehandlede celler og observere om effekten opprettholdes eller blir snudd.

I tillegg kan RAW 264,7 cellene eller humane primære monocytter omdannes til skumceller ved å stimulere med oxLDL og disse kan være en god *in vitro* modell til lipidholdige monocytter/makrofager i aterosklerotiske plakk. Man kan måle legumainaktivitet og se om statiner har samme effekt på disse cellemodellene. Legumain er spesielt oppregulert i skulderregionen av aterosklerotisk plakk [46], som kan indikere at legumain kan være involvert i nedbrytning av ekstracellulær matriks eller aktivere proteaser i aterosklerotisk plakk.

Både cystatin C og E/M er inhibitorer av legumain og cystatin C proteinnivå er redusert i aterosklerotisk plakk. I tillegg er cathepsin B- og L-nivået økt i fravær av cystatin C. Det virker som at mangel på cystatin C fremmer aterosklerotisk prosess enten ved økt plakkstørrelse eller ved ekstracellulær matriks degradering [30, 48]. Effekten av statin på legumain-, cathepsin B- og L-aktivitet bør derfor studeres sammen med nivået av endogene inhibitorer av enzymene.

### 4.3 Effekt av statiner på MMP-2 og -9

Etter proteolytisk aktivering av proform kan MMP-er degradere ulike ekstracellulære matrikskomponenter ved fysiologisk pH. Både aktiv form av MMP-2 og -9 er oppdaget i aterosklerotiske plakk [25]. I en annen studie ble det vist at ved å stimulere RAW 264,7 celler med RANKL (50 ng/ml) i 24 timer økte MMP-9 mRNA-uttrykket 5 ganger og ytterligere 7,5 gangers økning etter 96 timer [68]. I denne oppgaven ble det også vist at RAW 264,7 celler etter stimulering med RANKL (25, 50 og 100 ng/ml) skiller ut både MMP-2 og -9, og mer sekresjon av MMP-9 enn MMP-2 ble observert.

I tidligere studier har atorvastatin vist å redusere mRNA-uttrykket av en av MMP-familien (MMP-1) [62]. I denne oppgaven prøvde vi å studere om atorvastatin har effekt på de andre MMP-familiene (MMP-2 og -9). I tidligere studier er det vist at statiner doseavhengig hemmer eller reduserer utskillelse av både MMP-2 og MMP-9 fra glattmuskelceller og makrofager [71]. Etter at RAW 264,7 cellene ble stimulert med RANKL, ble de behandlet med atorvastatin for å se om statinet har effekt på enzymene. Atorvastatin i konsentrasjon på 100 µM ser ut til å stimulere sekresjonen av MMP-9 men ikke MMP-2. Her var det få forsøk på grunn av tidsaspektet, dermed trengs det flere forsøk med ulike konsentrasjon av statiner til å trekke en konklusjon. Men i denne oppgaven ble det vist en metode som kan brukes videre for å studere om statiner har effekt på MMP-2 og -9. MMP-2 er et substrat for



---

legumain [41], og i videre studier kan man studere om det er en korrelasjon med reduksjon av legumainaktivitet og MMP-2 mengde.

## 5. Konklusjon

Denne oppgaven viser:

- For første gang at legumain- og cathepsin B-aktiviteten er signifikant redusert doseavhengig med syre- og laktonformene av atorva- og simvastatin i RAW 264,7 celler og humane primære monocytter.
- At det er en tilsvarende tendens til aktivitetsreduksjon av cathepsin L etter behandling med atorvastatin i humane primære monocytter.
- At laktonformene av begge statiner, og spesielt simvastatin, i RAW 264,7 celler har kraftigere hemmingsevne på legumain og cathepsin B enn syreformen.
- At differensierte humane makrofager skiller ut store mengder legumain og at atorvastatin reduserer både cellulært og utsilt mengde legumain.
- At RAW 264,7 celler skiller ut MMP-2 og -9 etter RANKL-stimulering (25, 50, 100 ng/ml) og at statiner i konsentrasjon på 100  $\mu$ M ser ut til å stimulere sekresjonen av MMP-9 men ikke MMP-2. Metoden kan være en god modell til å studere videre effekten av statiner på disse enzymene i samspill med legumain, cathepsin B og L.

## Referanseliste

1. Mayerl, C., et al., *Atherosclerosis research from past to present - on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow*. Virchows Archiv, 2006. **449**(1): p. 96-103.
2. Palozza, P., et al., *Lycopene in atherosclerosis prevention: An integrated scheme of the potential mechanisms of action from cell culture studies*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2010. **504**(1): p. 26-33.
3. Burnier, L., et al., *Intercellular Communication in Atherosclerosis*. Physiology, 2009. **24**(1): p. 36-44.
4. Hansson, G.K. and P. Libby, *The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword*. Nature Reviews Immunology, 2006. **6**(7): p. 508-519.
5. Inoue, M., et al., *Endothelial cell-selective adhesion molecule modulates atherosclerosis through plaque angiogenesis and monocyte-endothelial interaction*. Microvascular Research, 2010. **80**(2): p. 179-87.
6. Niki, E., *Do free radicals play causal role in atherosclerosis? Low density lipoprotein oxidation and vitamin E revisited*. J Clin Biochem Nutr, 2011. **48**(1): p. 3-7.
7. Mackness, B. and M. Mackness, *Anti-inflammatory properties of paraoxonase-1 in atherosclerosis*. Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease, 2010. **660**: p. 143-51.
8. Galkina, E. and K. Ley, *Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis*. Annual Review of Immunology, 2009. **27**: p. 165-197.
9. Bui, Q.T., M. Prempeh, and R.L. Wilensky, *Atherosclerotic plaque development*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(11): p. 2109-13.
10. Bot, I., et al., *Perivascular mast cells promote atherogenesis and induce plaque destabilization in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2007. **115**(19): p. 2516-2525.
11. Sun, J.S., et al., *Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines*. Nature Medicine, 2007. **13**(6): p. 719-724.
12. Doran, A.C., N. Meller, and C.A. McNamara, *Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2008. **28**(5): p. 812-819.
13. Woollard, K.J. and F. Geissmann, *Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions*. Nature Reviews Cardiology, 2010. **7**(2): p. 77-86.
14. Rocha, V.Z. and P. Libby, *Obesity, inflammation, and atherosclerosis*. Nature Reviews Cardiology, 2009. **6**(6): p. 399-409.
15. Zhao, M., et al., *Activation of the p38 MAP kinase pathway is required for foam cell formation from macrophages exposed to oxidized LDL*. Apmis, 2002. **110**(6): p. 458-468.
16. Libby, P., *Changing concepts of atherogenesis*. Journal of Internal Medicine, 2000. **247**(3): p. 349-358.
17. Jerome, W.G. and P.G. Yancey, *The role of microscopy in understanding atherosclerotic lysosomal lipid metabolism*. Microscopy and Microanalysis, 2003. **9**(1): p. 54-67.
18. Fishbein, M.C., *The vulnerable and unstable atherosclerotic plaque*. Cardiovascular Pathology, 2010. **19**(1): p. 6-11.
19. Puente, X.S., et al., *Human and mouse proteases: A comparative genomic approach*. Nature Reviews Genetics, 2003. **4**(7): p. 544-558.

20. Doucet, A. and C.M. Overall, *Protease proteomics: Revealing protease in vivo functions using systems biology approaches*. Molecular Aspects of Medicine, 2008. **29**(5): p. 339-358.
21. Turk, B., *Targeting proteases: successes, failures and future prospects*. Nature Reviews Drug Discovery, 2006. **5**(9): p. 785-799.
22. Ramos, O.H.P. and H.S. Selistre-De-Araujo, *Identification of metalloprotease gene families in sugarcane*. Genetics and Molecular Biology, 2001. **24**(1-4): p. 285-290.
23. Lelongt, B., et al., *Do matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 (gelatinases) play a role in renal development, physiology and glomerular diseases?* Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 2001. **10**(1): p. 7-12.
24. Reel, B., et al., *MMP-2 and MMP-9 Alteration in Response to Collaring in Rabbits: The Effects of Endothelin Receptor Antagonism*. Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics, 2009. **14**(4): p. 292-301.
25. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix-degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. Journal of Clinical Investigation, 1994. **94**(6): p. 2493-2503.
26. Lee, Y.S., H.T. Lan Tran, and Q. Van Ta, *Regulation of expression of matrix metalloproteinase-9 by JNK in Raw 264.7 cells: presence of inhibitory factor(s) suppressing MMP-9 induction in serum and conditioned media*. Exp Mol Med, 2009. **41**(4): p. 259-68.
27. Cambra, I., F.J. Garcia, and M. Martinez, *Clan CD of cysteine peptidases as an example of evolutionary divergences in related protein families across plant clades*. Gene, 2010. **449**(1-2): p. 59-69.
28. Barrett, A.J. and N.D. Rawlings, *Evolutionary lines of cysteine peptidases*. Biological Chemistry, 2001. **382**(5): p. 727-733.
29. Storer, A.C. and R. Menard, *Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases*, in *Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases* 1994, Academic Press Inc: San Diego. p. 486-500.
30. Lutgens, S.P.M., et al., *Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease*. Faseb Journal, 2007. **21**(12): p. 3029-3041.
31. Frlan, R. and S. Gobec, *Inhibitors of cathepsin B*. Current Medicinal Chemistry, 2006. **13**(19): p. 2309-2327.
32. Kembhavi, A.A., et al., *The 2 cysteine endopeptidases of legume seeds-purification and characterization by use of specific fluorometric assays*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1993. **303**(2): p. 208-213.
33. Shutov, A.D. and I.A. Vaintraub, *Degradation of storage proteins in germinating-seeds*. Phytochemistry, 1987. **26**(6): p. 1557-1566.
34. Takeda, O., et al., *Isolation and analysis of cDNA-encoding a precursor of canavalia-ensiformis asparaginyl endopeptidase (legumain)*. Journal of Biochemistry, 1994. **116**(3): p. 541-546.
35. Chen, J.M., et al., *Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(12): p. 8090-8098.
36. Mattock, K.L., et al., *Legumain and cathepsin-L expression in human unstable carotid plaque*. Atherosclerosis, 2010. **208**(1): p. 83-89.
37. Clerin, V., et al., *Expression of the cysteine protease legumain in vascular lesions and functional implications in atherogenesis*. Atherosclerosis, 2008. **201**(1): p. 53-66.
38. Li, D.N., et al., *Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase in vitro and in vivo*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(40): p. 38980-38990.

39. Morita, Y., et al., *Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells*. Febs Letters, 2007. **581**(7): p. 1417-1424.
40. Sarandeses, C.S., et al., *Prothymosin alpha is processed to thymosin alpha(1) and thymosin alpha(11) by a lysosomal asparaginyl endopeptidase*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(15): p. 13286-13293.
41. Ishizaki, T., et al., *The asparaginyl endopeptidase legumain after experimental stroke*. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2010. **30**(10): p. 1756-1766.
42. Miller, G., et al., *Asparagine endopeptidase is required for normal kidney physiology and homeostasis*. FASEB J, 2011.
43. Manoury, B., et al., *An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 695-699.
44. Sepulveda, F.E., et al., *Critical Role for Asparagine Endopeptidase in Endocytic Toll-like Receptor Signaling in Dendritic Cells*. Immunity, 2009. **31**(5): p. 737-748.
45. Choi, S.J., et al., *Identification of human asparaginyl endopeptidase (legumain) as an inhibitor of osteoclast formation and bone resorption*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(39): p. 27747-27753.
46. Papaspyridonos, M., et al., *Novel candidate genes in unstable areas of human atherosclerotic plaques*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2006. **26**(8): p. 1837-1844.
47. Johansen, H.T., C.G. Knight, and A.J. Barrett, *Colorimetric and fluorimetric microplate assays for legumain and a staining reaction for detection of the enzyme after electrophoresis*. Analytical Biochemistry, 1999. **273**(2): p. 278-283.
48. Alvarez-Fernandez, M., et al., *Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(27): p. 19195-19203.
49. Uchiyama, Y., et al., *Cell and tissue distribution of lysosomal cysteine proteinases, cathepsin-B, cathepsin-H, and cathepsin-L, and their biological roles*. Acta Histochemica Et Cytochemica, 1994. **27**(4): p. 287-308.
50. Kuester, D., et al., *The cathepsin family and their role in colorectal cancer*. Pathology Research and Practice, 2008. **204**(7): p. 491-500.
51. Jormsjo, S., et al., *Differential expression of cysteine and aspartic proteases during progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. American Journal of Pathology, 2002. **161**(3): p. 939-945.
52. Li, W., et al., *Cathepsin L is significantly associated with apoptosis and plaque destabilization in human atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2009. **202**(1): p. 92-102.
53. Moghadasian, M.H., *Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors*. Life Sciences, 1999. **65**(13): p. 1329-1337.
54. Endo, A., *A historical perspective on the discovery of statins*. Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences, 2010. **86**(5): p. 484-493.
55. Shitara, Y. and Y. Sugiyama, *Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions*. Pharmacology & Therapeutics, 2006. **112**(1): p. 71-105.
56. Jasiska, M., J. Owczarek, and D. Orszulak-Michalak, *Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects*. Pharmacological Reports, 2007. **59**(5): p. 483-499.
57. van Leuven, S.I. and J.J.P. Kastelein, *Atorvastatin*. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2005. **6**(7): p. 1191-1203.

- 
58. Skottheim, I.B., et al., *Statin induced myotoxicity: The lactone forms are more potent than the acid forms in human skeletal muscle cells in vitro*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **33**(4-5): p. 317-325.
  59. Prueksaritanont, T., et al., *beta-oxidation of simvastatin in mouse liver preparations*. Drug Metabolism and Disposition, 2001. **29**(10): p. 1251-1255.
  60. Prueksaritanont, T., et al., *Glucuronidation of statins in animals and humans: A novel mechanism of statin lactonization*. Drug Metabolism and Disposition, 2002. **30**(5): p. 505-512.
  61. Jones, P., et al., *Comparative dose efficacy study of Atorvastatin versus Simvastatin, Pravastatin, Lovastatin, and Fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (The CURVES study)*. American Journal of Cardiology, 1998. **81**(5): p. 582-587.
  62. Wang, Z.H., et al., *Pleiotropic Effects of Atorvastatin on Monocytes in Atherosclerotic Patients*. Journal of Clinical Pharmacology, 2010. **50**(3): p. 311-319.
  63. Kolovou, G.D., et al., *Simvastatin: Two decades in a circle*. Cardiovascular Therapeutics, 2008. **26**(2): p. 166-178.
  64. Robinson, J.G., *Simvastatin: present and future perspectives*. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2007. **8**(13): p. 2159-2172.
  65. Billecke, S., et al., *Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters*. Drug Metabolism and Disposition, 2000. **28**(11): p. 1335-1342.
  66. Barrett, A.J. and H. Kirschke, *Cathepsin-B, cathepsin-H, and cathepsin-L*. Methods in Enzymology, 1981. **80**: p. 535-561.
  67. Bradford, M.M., *Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
  68. Fava, R.A., et al., *The synthetic triterpenoid TP-222 inhibits RANKL stimulation of osteoclastogenesis and matrix metalloproteinase-9 expression*. Journal of Rheumatology, 2007. **34**(5): p. 1058-1068.
  69. Raschke, W.C., et al., *Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia-virus*. Cell, 1978. **15**(1): p. 261-267.
  70. Ali, Z.A., *Regulation of legumain activity by cystatin M in various cell lines*, in *Department of Pharmaceutical Biosciences* 2008, University of Oslo: Oslo.
  71. Luan, Z.X., A.J. Chase, and A.C. Newby, *Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1,-2,-3, and-9 from vascular smooth muscle cells and macrophages*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2003. **23**(5): p. 769-775.

# APPENDIKS

## Løsninger

### *Celledyrking*

#### RAW 264,7 dyrkingsmedium:

DMEM med 4 mM L-glutamin, 4,5 g/l glukose	500 ml
Natriumbicarbonat	10 ml
Føtalt bovint serum (FBS)	50 ml
Penicillin 10000 U/ml og streptomycin 10 mg/ml	5 ml

#### 1 x PBS:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{Na}_2 \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6 g
NaCl	8 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1,0 l

#### Lysisbuffer (pH 5,8):

$\text{Na}_3 \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mM
$\text{Na}_2(\text{EDTA})$	1 mM
N-oktyl- $\beta$ -D-glukopyranosid	1 % (w/V)

### *Legumainaktivitet*

#### Legumain-assaybuffer (pH 5,8):

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	39,5 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	121 mM

---

Na <sub>2</sub> (EDTA)	1 mM
CHAPS	0,01 %
DTT (tilsettes rett før bruk)	1 mM

---

Legumain-substratløsning (34 µM):

---

2,5 mM Z-Ala-Ala-Asn-NHMec (løst i DMSO)	200 µl
Legumain-asseybuffer	14,5 ml

***Cathepsin B-aktivitet***

---

Cathepsin B-assaybuffer (pH 5,5):

---

Natriumacetat	200 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	4 mM
DTT (tilsettes rett før bruk)	8 mM

---

”Prøvebuffer” til cathepsin B-aktivitetsmåling:

---

Cathepsin B-assaybuffer	6 ml
dH <sub>2</sub> O	4 ml

---

Cathepsin B-substratløsning (68 µM):

---

1 mM Z-Arg-Arg-NHMec (løst i DMSO)	2 ml
dH <sub>2</sub> O	27,4 ml

***Cathepsin L-aktivitet***

---

Cathepsin L-assaybuffer (pH 5,5):

---

Natriumacetat	200 mM
Na <sub>2</sub> (EDTA)	4 mM



---

Brij (0,1 %):

---

Brij 35	0,5 g
dH <sub>2</sub> O	0,5 l

---

Hjelpeoppløsning (8 mM DTT med 0,1 % Brij ):

---

DTT (200 mM)	400 µL
Brij (0,1 %)	10 ml

---

”Prøvebuffer” til cathepsin L-aktivitetsmåling:

---

Cathepsin L-assaybuffer	14,3 ml
Hjelpeoppløsning (8 mM DTT med 0,1 % Brij )	10 ml

---

Cathepsin L-substratløsning (80 µM)

---

500 µM Z-Phe-Arg-NHMec	4 ml
Cathepsin L-assaybuffer	21 ml

---

CA-074 (5 µM):

---

10 µM CA-074	2 µl
0,1 % Brij	3998 µl

---

Z-FY(t-Bu)-DMK (100 µM):

---

1 mM Z-FY( t-Bu)-DMK fortynnet i 0,1 % brij (1:10)

***Totalprotein***

---

Coomassieoppløsning (1:5):

---

Coomassiekonsentrat ”Protein Assay Dye Reagent Concentrate”	10 ml
---	-------

---

dH <sub>2</sub> O	40 ml
-------------------	-------

***Zymografi***Separerende gel 10 % (2 geler):

---

1,5 M Tris pH 8,8	3,25 ml
Acrylamid/Bis (monomer)	4,33 ml
SDS 10 %	130 µl
2 % gelatin	650 µl
dH <sub>2</sub> O	4,58 ml
Ammoniumpersulfat (APS )10 %	65 µl
TEMED	6,5 µl

Konsentrerende gel:

---

0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml
Acrylamid/Bis (monomer)	1,3 ml
SDS 10 %	100 µl
dH <sub>2</sub> O	6,10 ml
APS 10 %	50 µl
TEMED	10 µl

“Sample” buffer:

---

0,5 M Tris pH 6,8	1 ml
SDS 10 %	1,6 ml
Glycerol 100 %	0,8 ml
Bromfenolblått 0,5 %	80 µl

---

dH <sub>2</sub> O	520 µl
-------------------	--------

---

Inkuberingsbuffer (pH 7,6):

---

50 mM Tris	3 g
0,2 M NaCl	5,84 g
5 mM CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,37 g
0,02 % Brij (polyoxyetylen)	0,1 g
Justér pH til 7,6	

---

2,5 % Triton-x:

---

Triton X-100	2,5 ml
dH <sub>2</sub> O	100 ml

***ELISA***

---

Vaskebuffer (0,05 % Tween i PBS):

---

Tween	0,5 ml
PBS	1 l

---

***Prosedyre for Aceton-felling av cellelysatsprøver til Western blotting***

Prøvene måles for totalprotein på forhånd.

1. Tilsett kald aceton (100 %) til cellelysatsprøvene slik at sluttkonsentrasjonen blir 80 % (v/v) i et nytt eppendorfrør og bland ved hjelp av vortex.
2. Prøvene settes i fryser ved -20 °C i 1 time etterfulgt av sentrifugering ved 15,000 x g og 4 °C i 20 minutter.
3. Supernatanten suges forsiktig av og kastes.
4. Pelleten tørkes i 20-30 minutter ved romtemperatur.
5. Deretter tilsettes 13 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl loadingbuffer og 2 µl reduksjonsmiddel (DTT) i alle prøver og blandes ved hjelp av vortex. Sluttkonsentrasjonen av prøvene blir 1 µg/µl.
6. Prøvene kokes i vannbad i 5 min slik at proteinene denatureres.